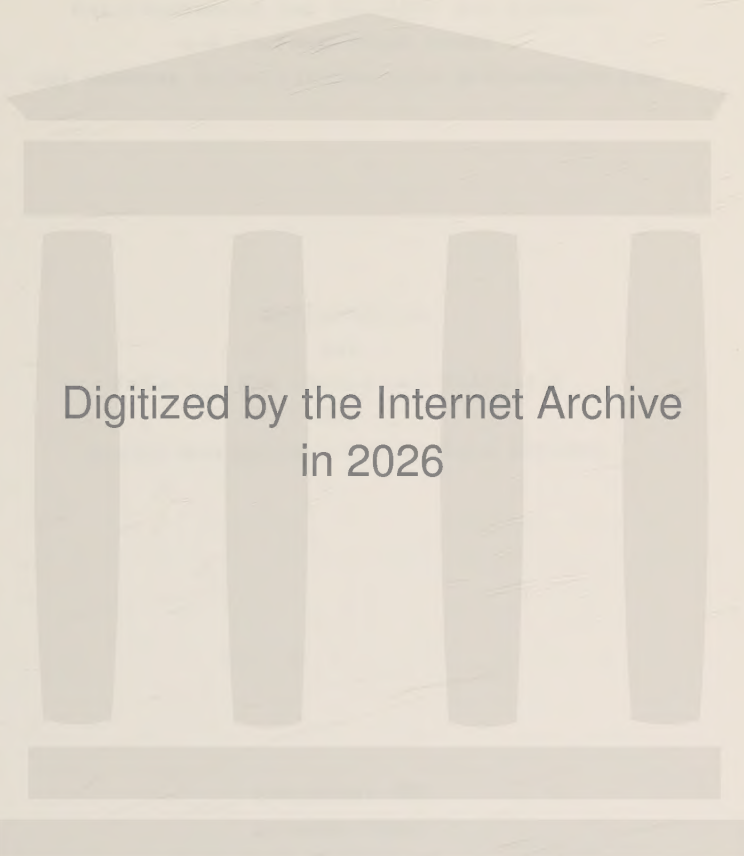


ÜBER LIPIDE AUS ARCHAEBAKTERIEN

**Untersuchungen zur Struktur von Lipiden
aus *Thermoproteus tenax*
und anderen schwefelabhängigen
Archaeobakterien**

Stephan Thurl



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554808_0065

ÜBER LIPIDE AUS ARCHAEBAKTERIEN

Untersuchungen zur Struktur von Lipiden
aus *Thermoproteus tenax*
und anderen schwefelabhängigen Archaeobakterien

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Stephan Thurl
aus Rosenheim

München, 1986

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Schäfer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Th. Severin

Tag der mündlichen Prüfung: 1. 7. 1986

Meinen Eltern
gewidmet

I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL UND METHODEN	8
1. Bakterienzucht	8
2. Lipidextraktion	9
3. Gewinnung von Zellen ohne adsorbierte Schwefelpartikel	10
4. Fraktionierung des Lipidextraktes	10
5. Analytische Dünnschichtchromatographie	11
6. Präparative Dünnschichtchromatographie	12
7. Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	13
7.1 Trennung der Tetraether	13
7.2 Trennung der isoprenoiden Chinone	14
8. Chemische Abbaureaktionen	15
8.1 Hydrolysen	15
8.2 Etherspaltungen	15
8.3 Reduktionen	16
9. GC- und GC/MS-Analysen	16
10. Quantitative Zuckerbestimmung	19
11. Methylierungsanalyse	20
12. Quantitative Glycerinbestimmung	21
13. Quantitative Phosphatbestimmung	21
14. Spektroskopische Methoden	22
III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	23
1. Glycerolipide aus Thermoproteus tenax	23
1.1 Isolierung und Fraktionierung der Lipide	23
1.2 Bausteinanalyse der Lipidfraktionen	27
1.2.1 Fettsäuremethylester	29
1.2.2 Phytanylchlorid	31
1.2.3 C ₄₀ -Kohlenwasserstoffe	32
1.2.4 Glucose	37
1.2.5 Myo-Inosit	37
1.2.6 Glycerin	38

1.3 Analyse der hydrophoben Grundkörper	39
1.3.1 DC-Bande 1: Glycerin-diether	40
1.3.2 DC-Bandenpaket 3: Diglycerin-tetraether	41
1.3.2.1 Analyse des gesamten Bandenpakets	42
1.3.2.2 Analyse der Einzelkomponenten	49
1.4 Analyse der Glykolipide	53
1.4.1 Glykolipid A: Monoglucosyl-tetraether	54
1.4.2 Glykolipid C (autotroph): Diglucosyl-tetraether	56
1.4.3 Glykolipid D: Triglucosyl-tetraether	59
1.5 Analyse der Phospholipide	61
1.5.1 Alkalische Hydrolyse der einzelnen Phospholipide	61
1.5.2 Phospholipid C: Monoglucosyl-tetraether-myo-inosit-phosphat	63
1.5.3 Phospholipid E (autotroph)	64
1.6 Diskussion der Ergebnisse der Analyse der Glycerolipide	67
2. Glycerolipide aus <i>Thermoproteus species H₃</i>	73
3. Glycerolipide aus <i>Sulfolobus species B6/2</i>	75
4. Isoprenoide Chinone aus schwefelabhängigen Archaeobakterien	77
4.1 Isoprenoide Chinone aus <i>Thermoproteus tenax</i>	77
4.1.1 Analyse der DC-Bande mit R_F 0,7: Menachinone	78
4.1.2 Analyse der DC-Bande mit R_F 0,75: Methylmenachinon	84
4.2 Isoprenoide Chinone aus <i>Desulfurolobus ambivalens</i>	87
4.2.1 Analyse der DC-Bande mit R_F 0,6: Menachinon MK-6-(12H)	87
4.2.2 Analyse der DC-Doppelbande mit R_F 0,5: Caldariella- und Sulfolobus-chinone	88

4.3 Isoprenoide Chinone in <i>Thermococcus celer</i> , <i>Desulfurococcus mobilis</i> und <i>Desulfurococcus</i> <i>mucosus</i>	94
4.4 Diskussion der Ergebnisse der Analyse der isoprenoiden Chinone	95
 IV. ZUSAMMENFASSUNG	 98
 V. LITERATURVERZEICHNIS	 101
 VI. ABKÜRZUNGEN	 111

I. EINLEITUNG

Woese und Fox postulierten 1977 die Archaeobakterien als sogenanntes drittes Urreich neben den Eukaryonten und Eubakterien (1). Die Archaeobakterien wurden aufgrund großer Unterschiede in den 16S bzw. 18S rRNA-Sequenzen als eigenständige Gruppe erkannt (2). Diese Einteilung wird durch das Vorkommen von Etherlipiden anstelle der sonst üblichen Esterlipide bestätigt (3). Wie Eubakterien sind die Archaeobakterien strukturell einfach gebaut, besitzen keine Zellkernmembran, sind also ebenfalls prokaryontischer Natur. Die Archaeobakterien unterscheiden sich jedoch von den Eubakterien in einer Reihe wichtiger Eigenschaften, in denen sie häufig den Eukaryonten nahe stehen: so ist die Zellwand von Archaeobakterien häufig aus Proteinen, jedoch nie aus Murein aufgebaut (4); Archaeobakterien zeigen Resistenz gegenüber einigen bei Eubakterien wirksamen Antibiotika (5); das Proteilmuster der DNA-abhängigen RNA-Polymerase in Archaeobakterien ist komplexer als das der Eubakterien (5). Gemeinsamkeiten zwischen Archaeobakterien und Eukaryonten finden sich auch beim Translationsapparat: der archaeobakterielle Elongationsfaktor EF II ist ADP-ribosylierbar (6), die Sequenzen der ribosomalen Proteine sind vergleichbar (7).

Viele Archaeobakterien leben unter extremen Umweltbedingungen, wie sie vor drei bis vier Milliarden Jahren, zur Zeit der Entstehung des Lebens auf der Erde, geherrscht haben mögen (8). So können die methanogenen Archaeobakterien nur in streng anaeroben Habitaten existieren (9); *Thermoplasma acidophilum*, ein zellwandloses Archaeobakterium, wurde aus schwelenden Kohlehalden isoliert (10); die halophilen Archaeobakterien leben nur in extrem salzhaltigen Biotopen (11). Die schwefelabhängigen Archaeobakterien stellen die extremsten thermophilen Lebewesen dar; sie kommen in heißen

schwefelhaltigen vulkanischen Quellen (Solfataren) an Land oder am Meeresboden vor (12). Der größte Teil dieser Organismen zeigt erst bei Temperaturen über 80 °C optimales Wachstum (13). *Pyrodictium occultum* wächst sogar noch bei einer Temperatur von 110 °C (12); andere Organismen gedeihen in heißen, schwefelsauren Gewässern bei pH-Werten von 1-4 (13). Berücksichtigt man, daß die Proteine keinen außergewöhnlichen Aufbau besitzen (13) und dennoch nicht denaturiert werden, daß der Guanin/Cytosin-Gehalt der DNA eher an der unteren möglichen Grenze (30-60%) liegt (12), und die DNA demzufolge bei 80-90 °C "schmelzen" sollte, daß ATP als Energielieferant dient, obwohl es bei den Wachstumstemperaturen mit einer Halbwertszeit von etwa 30 Minuten hydrolysiert (12), dann erkennt man, wie einzigartig diese Organismen ihrem Lebensraum angepaßt sein müssen.

Eine Antwort auf die Frage, wie Archaeobakterien hohe Temperaturen und große Saure- bzw. Salzkonzentrationen tolerieren können, suchte man auch im Bau ihrer Cytoplasmamembranen, in der Struktur der Membranlipide. Eukaryonten und Eubakterien besitzen als Membranlipide überwiegend Esterlipide, die aus Fettsäuren und Alkoholen aufgebaut sind (3); es dominieren Glycerolipide, und zwar sn-1,2-Diacylglyceride (Abb. 1A), d.h. Ester aus Fettsäuren und Glycerin, an dessen freier Hydroxylgruppe hydrophile Komponenten wie Phosphatgruppen oder Zuckerreste gebunden sind (14). Die archaeobakteriellen Membranlipide sind Etherlipide, bei denen Glycerin in sn-2,3-Konfiguration mit perhydrierten, isoprenoiden Kohlenwasserstoffen über Etherbindungen verknüpft ist (3). (Abb. 1B). Die freien Hydroxylgruppen sind, wie bei den Membranlipiden der Eukaryonten und Eubakterien, mit Phosphatgruppen oder Zuckerresten verknüpft (3, 15).

Das Vorkommen von Fettsäuren bzw. Esterlipiden in Archaeobakterien ist umstritten. Kates et al. zeigten, daß in *Halo-bacterium cutirubrum* radioaktiv markierte Vorstufen in geringer Menge in Fettsäuren eingebaut werden (16, 17). Eine

von Schafer und Oesterhelt in dem nahe verwandten Halobacterium halobium durchgeführte Fettsäureanalyse ergab hingegen, daß die auf synthetischem Material gewachsenen Zellen keine Fettsäuren enthalten (18).

Die beiden dominierenden Etherlipide aus der Vielzahl der bisher gefundenen Varianten sind das 2,3-Di-O-phytanyl-sn-glycerin, bei dem Glycerin mit zwei Phytanylresten verknüpft ist (Abb. 1B), und das 2,3,2',3'-Tetra-O-dibiphytanyl-di-sn-glycerin (3), (Abb. 1C).

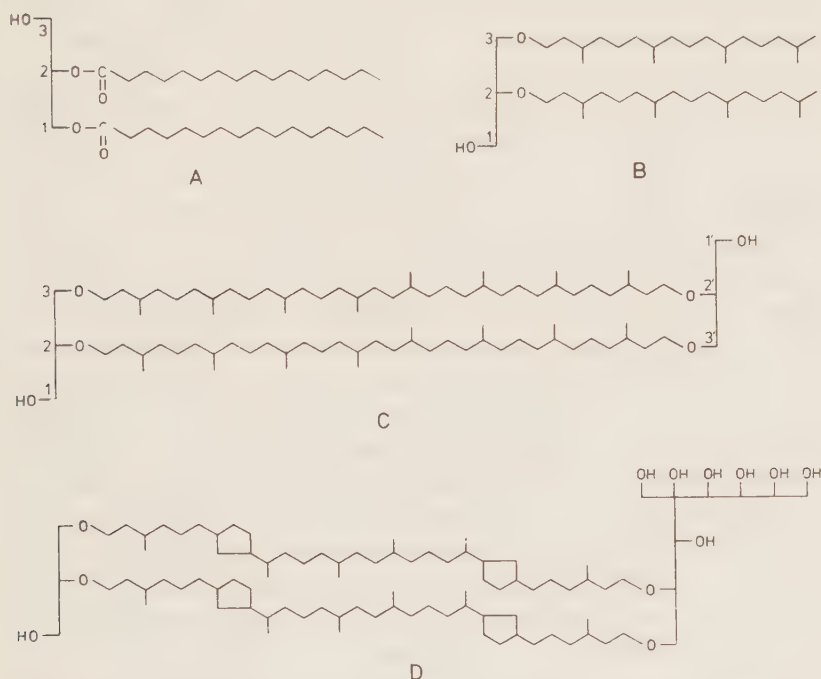


Abb. 1. Strukturen hydrophober Grundkörper von Membranlipiden aus Eubakterien und Archaeobakterien.

A: 1,2-Distearoyl-sn-glycerin; B: 2,3-Di-O-phytanyl-sn-glycerin (Glycerin-diether); C: 2,3,2',3'-Tetra-O-dibiphytanyl-di-sn-glycerin (Diglycerin-tetraether); D: Glycerin-nonit-tetraether.

Das Tetraethermolekül ist ein Dimeres aus zwei Diethermolekülen, deren isoprenoide Enden durch Kopf-Kopf-Verknüpfung kovalent miteinander verbunden sind. Neben Diglycerin-tetraethern fanden De Rosa et al. (19) in *Sulfolobus solfataricus* Glycerinnonit-tetraether, bei denen ein Nonit an die Stelle eines Glycerinmoleküls tritt (Abb. 1D).

Die Lipide in Eubakterien und Archaeobakterien können als Markersubstanzen bei der Einteilung der Mikroorganismen verwendet werden, da sich die verschiedenen Ordnungen häufig durch spezifische Lipidmuster auszeichnen (20). Diether wurden in großer Menge in Halobakterien, in wechselnder Menge in den methanogenen und in geringer Menge in den schwefelabhängigen Archaeobakterien gefunden, während Tetraether in den schwefelabhängigen Archaeobakterien als Hauptkomponente, in den methanogenen Archaeobakterien in wechselnder Menge und in den Halobakterien überhaupt nicht gefunden wurden (3). Die Tetraether in den methanogenen Archaeobakterien enthalten, mit Ausnahme von *Methanosarcina barkeri* (21), acyclische isoprenoide C_{40} -Kohlenwasserstoffketten; in den schwefelabhängigen Archaeobakterien wurden acyclische und cyclische C_{40} -Kohlenwasserstoffketten mit ein bis vier Cyclopentanringen gefunden (3, 15). Durch die Bildung von Cyclopentanringen werden die Rotationsmöglichkeiten der Alkylketten der Membranlipide eingeschränkt. Die Organismen konnten auf diese Weise ihre Membranfluidität verringern und sich so erhöhten Temperaturen anpassen (3).

Mit der Entdeckung der Tetraetherstrukturen wurde das Konzept der biologischen Membran erweitert. Bisher stellte man sich Zellmembranen nach dem Modell von Singer und Nicolson (22) als Lipiddoppelschicht (bilayer) vor, in der bewegliche Membranproteine eingelagert sind (Abb. 2A). Als Beispiel für eine solche Membran möge die Cytoplasmamembran von *Halobacterium halobium* stehen. Die Tetraether hingegen durchspannen wahrscheinlich die gesamte Membran und bilden, wie bei *Sulfolobus solfataricus*, eine einfache Lipidschicht (monolayer), (3), (Abb. 2B).

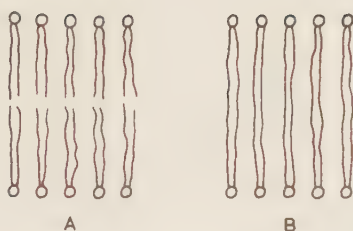


Abb. 2. Schematischer Vergleich zwischen einer Lipid "bilayer" Membran (A) und einer Lipid "monolayer" Membran (B).

Kreise: hydrophile Komponenten der Membranlipide; Striche: hydrophobe Kohlenwasserstoffketten der Membranlipide.

Neben den oben beschriebenen Lipiden, die die Grundbausteine der Cytoplasmamembran darstellen und in relativ großer Menge vorkommen, fand man in Archaeobakterien in geringer Menge isoprenoide Chinone, die wahrscheinlich an Elektronentransportvorgängen bei der Energiegewinnung in der Membran beteiligt sind (23). Bisher isolierte man Menachinone aus Halobakterien (23), ein Methylmenachinon aus *Thermoplasma acidophilum* (24) und ein schwefelhaltiges Chinon aus *Sulfolobus*-Spezies (25), (Abb. 3).

Isoprenoide Chinone, vor allem Menachinone und Ubichinone, sind bei Eubakterien weit verbreitet und werden auch zu taxonomischen Zwecken untersucht (23).

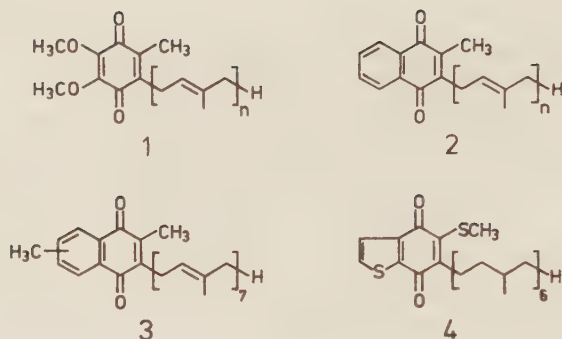


Abb. 3. Strukturen isoprenoider Chinone aus Eubakterien und Archaeobakterien.

1: Ubichinone, $n = 1-12$; 2: Menachinone, $n = 1-14$; 3: 5- oder 8-Methylmenachinon aus *Thermoplasma acidophilum*; 4: Benz[*b*]thiophen-4,7-chinon (Caldariella-chinon) aus *Sulfolobus*-Spezies.

In dieser Arbeit wurden die Lipide des schwefelabhängigen Archaeobakteriums *Thermoproteus tenax* (26), dem Hauptvertreter der Ordnung Thermoproteales, charakterisiert. Die anaerob wachsenden Thermoproteales, die zur Energiegewinnung Schwefel zu Schwefelwasserstoff reduzieren (27), bilden neben den aeroben, Schwefel zu Schwefelsäure oxidierenden Sulfolobales (13), die zweite Ordnung der schwefelabhängigen Archaeobakterien (5). Zu Beginn dieser Arbeit waren im Zweig der schwefelmetabolisierenden Archaeobakterien nur die Lipide einiger *Sulfolobus*-Arten untersucht worden (3, 15). *Thermoproteus tenax* wächst entweder heterotroph durch Schwefelatmung oder autotroph mit Wasserstoff als Reduktionsmittel und Kohlendioxid als einziger Kohlenstoffquelle (27). Die vorliegenden Untersuchungen wurden vorwiegend mit autotroph gezogenen Zellen durchgeführt, denn die geplante Prüfung auf Fettsäuren ließ sich besser mit Zellen aus einem definierten

Nährmedium durchföhren als mit heterotroph gewachsenen Kulturen, denen Fettsäuren enthaltender Hefeextrakt zugesetzt werden mußte (s. Kapitel III.1.2.1). Die Lipide aus heterotroph gezogenen Zellen wurden untersucht, um den Einfluß der unterschiedlichen Wachstumsbedingungen auf die Struktur der Lipide zu studieren.

Die Lipide von *Thermoproteus species' H₃* und *Sulfolobus species B6/2*, zwei weiteren schwefelabhängigen Archaeobakterien, sollten mit den Lipiden von *Thermoproteus tenax* bzw. von *Sulfolobus*-Spezies verglichen werden, um die taxonomische Einordnung dieser beiden, bisher noch nicht beschriebenen Organismen, zu überprüfen.

Außerdem wurden die isoprenoiden Chinone der schwefelabhängigen Archaeobakterien *Thermoproteus tenax* (26), *Desulfurolobus ambivalens* (28), *Thermococcus celer* (29), *Desulfurococcus mucosus* (30) und *Desulfurococcus mobilis* (30) untersucht. Diese Organismen besitzen unterschiedliche Möglichkeiten zur Energiegewinnung und es stellte sich die Frage, ob sich diese Unterschiede im Vorkommen und der Struktur von isoprenoiden Chinonen widerspiegeln. *Desulfurolobus ambivalens* (28), ein von Zillig et al. (31) und Stetter et al. (32) unabhängig voneinander entdecktes Archaeobakterium, vereint die Stoffwechseleigenschaften der Schwefel reduzierenden Thermoproteales und der Schwefel oxidierenden Sulfolobales. Von der Chinonanalyse dieses Organismus erhoffte man sich Aussagen über den Energiestoffwechsel und die taxonomische Einordnung.

II. MATERIAL UND METHODEN

Die verwendeten Lösungsmittel und Chemikalien waren von p.A.-Qualität, das Wasser war bidestilliert.

1. Bakterienzucht

a) *Thermoproteus tenax*

Autotrophe Zucht: die Zellen wurden in 50 l Glasflaschen bei 88 °C und einem pH-Wert von 5,4, der mit 1N Schwefelsäure eingestellt wurde, gezogen. Zum Medium nach Brock (33) gab man 5 g/l Schwefel und 0,5 mg/l Resazurin, als Sauerstoffindikator. Reduzierende Bedingungen wurden durch Einleiten von Schwefelwasserstoff erzeugt. Während des Wachstums wurde mit einem Gemisch aus Kohlendioxid und Wasserstoff (2:1) begast und kraftig gerührt. Nach etwa 4 Tagen wurden die Kulturen gekühlt. Nachdem sich der Schwefel abgesetzt hatte, zentrifugierte man die Bakterien aus dem Überstand in einer Durchlaufzentrifuge ab und bewahrte sie in flüssigem Stickstoff auf. Die Ausbeuten betrugen je nach Organismus 0,15 - 0,20 g Zellen/l Nährmedium.

Heterotrophe Zucht: die Zellen wurden in einem 250 l Stahlfermenter, wie oben beschrieben, gezogen. Als Kohlenstoffquellen setzte man dem oben beschriebenen Medium 0,4 g/l Hefeextrakt und 10 g/l Glucose zu. Reduzierende Bedingungen wurden durch Zugabe von 0,2 g/l Na_2S erzeugt. Die Kulturen begaste man mit Kohlendioxid.

b) *Thermoproteus species H₃*

Die Zucht erfolgte autotroph wie bei *Thermoproteus tenax* beschrieben.

c) *Sulfolobus species B6/2*

Sulfolobus species B6/2 wurde autotroph in 50 l PVC-Behaltern bei 80 °C und pH 2,5 gezogen. Der pH-Wert wurde automatisch mit Calciumcarbonat eingestellt. Dem Medium nach Brock (33) fugte man 10 g/l Schwefel zu. Die Kulturen wurden andauernd gerührt und mit einem Gemisch aus 95% Druckluft und 5% Kohlendioxid begast.

d) *Desulfurolobus ambivalens*, *Thermococcus celer*, *Desulfurococcus mucosus* und *Desulfurococcus mobilis*

Diese Organismen wurden, wie in der Literatur beschrieben, gezüchtet (28, 29, 30).

2. Lipidextraktion

Die tiefgefrorenen Zellen wurden in Wasser suspendiert, durch Behandlung mit einer French Press oder mit Ultraschall aufgebrochen und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde durch mehrmaliges, jeweils dreistündiges Rühren bei Raumtemperatur mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln (jeweils 30 ml pro g Lyophilisat) extrahiert (34).

Thermoproteus tenax:

- Extraktion 3x mit Chloroform/Methanol 2:1 oder
- Extraktion 2x mit Chloroform/Methanol 2:1 und
2x mit Chloroform/Methanol/Wasser 60:30:4,5

Thermoproteus species H₃:

- Extraktion 1x mit Chloroform/Methanol 2:1

Sulfolobus B6/2:

- Extraktion 3x mit Chloroform/Methanol 2:1

Desulfurolobus ambivalens, *Thermococcus celer*, *Desulfurococcus mobilis*, *Desulfurococcus mucosus*:

- Extraktion 1x mit Aceton, 2x mit Chloroform/Methanol 2:1
und 2x mit Chloroform/Methanol/Wasser 60:30:4,5.

3. Gewinnung von Zellen ohne adsorbierte Schwefelpartikel

Die tiefgefrorenen Zellen wurden in Wasser suspendiert und auf einen Sucrosegradienten aufgetragen. Man stellte dazu einen linearen Gradienten her von 28% Sucrose und 9% Glucose nach 56% Sucrose und 18% Glucose in einem Puffer pH 7,9 aus 10mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 1mM Ethylendiamintetraacetat und 100mM NaCl. Die Proben wurden 30 h bei 28000 U/min mit einem SW28 Rotor (Beckmann) ins Gleichgewicht bandiert. Nach Abziehen der darüber liegenden Suspension wurde eine breite Bande aus Zellen bzw. Zellfragmenten ohne Schwefelpartikel abdekantiert, in einer French Press zerkleinert und wie üblich aufgearbeitet. Elementarer Schwefel und mit Schwefelkornern behaftete Zellen waren beim Zentrifugieren als Bodensatz zurückgeblieben.

4. Fraktionierung des Lipidextraktes

1,5 g Lipidextrakt, suspendiert in 250 ml Chloroform, wurden auf einer Kieselgelsäule (5x16 cm Säule, gepackt mit 150 g Kieselgel 60 reinst, 0,063-0,200 mm Korngröße, Merck) in Neutrallipide und polare Lipide aufgetrennt (34). Die Neutrallipide eluierte man mit 3 l Chloroform, die polaren Lipide mit 3 l Methanol bei einer Fließgeschwindigkeit von 10 ml/min.

Die polaren Lipide (etwa 500 mg), gelöst in 50 ml Chloroform/Methanol/Wasser 60:30:4,5, trennte man durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose (5x22 cm Säule, gepackt gemäß Rouser (35) mit 110 g Servacel DEAE-Cellulose 23 SS, analytical grade, Serva) in Glyko- und Phospholipide (34). Man eluierte die Glykolipide mit 2,5 l Chloroform/Methanol 7:3 bei einer Fließgeschwindigkeit von 15 ml/min, Pigmente (z.B. Resazurin) mit 1,3 l Chloroform/Essigsäure 3:1 und entfernte überschüssigen Eisessig mit 1,3 l Methanol. Mit 2,5 l eines Gemisches aus Chloroform/Me-

thanol/33%Ammoniak/Ammoniumacetat 70ml:30ml:2ml:0,4g eluierte man die weniger polaren Phospholipide. Die stärker polaren Phospholipide wurden mit 2,5 l eines Puffers aus Chloroform/Methanol/Wasser/Kaliumhydrogenphthalat 60ml:30ml:4,5ml:0,18g, der mit konzentrierter Salzsäure auf pH 2,5 eingestellt war, eluiert. Die Puffersalze in den Phospholipidfraktionen wurden durch Verteilen des eingeengten Materials zwischen Ober- und Unterphase von Chloroform/Methanol/Wasser 2:1:0,6 entfernt.

5. Analytische Dünnschichtchromatographie

Die analytische DC wurde in Horizontalkammern (HPTLC Linear 28510, Camag) mit HPTLC-Fertigplatten (10x10 cm Glasplatten mit Kieselgel 60 bzw. RP-18 Material, F₂₅₄, Merck) durchgeführt.

Folgende Laufmittelsysteme wurden benutzt:

- Glyko- und Phospholipide (36): $\text{HCCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 65:25:4
- Hydrophobe Grundkörper: $\text{HCCl}_3/\text{Ethylacetat}$ 85:15 oder
 $\text{HCCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1
- Isoprenoide Chinone (37): Hexan/Diethylether 85:15 bei
Kieselgel 60
Aceton/ H_2O 99:1 bei RP-18
Material

Die Lipide wurden unspezifisch detektiert mit 50%iger methanolischer Schwefelsäure (38), wobei die Substanzen bei 150 °C verkohlt wurden. Die Phospholipide wurden spezifisch mit dem Molybdänblau-Reagens (39) sichtbar gemacht, die Chinone mit Leukomethylenblau (38), in das vor Gebrauch Stickstoff bis zur Entfärbung eingeleitet wurde.

6. Preparative Dunnschichtchromatographie

Tabelle 1 gibt die Arbeitsbedingungen bei der preparativen DC für die verschiedenen Lipidfraktionen an.

Tabelle 1: Bedingungen bei der preparativen DC.

	Lösungs- mittel	Laufmittel	Extraktions- mittel
Hydrophobe Grundkörper	HCCl_3	Hexan- Ethylacetat (85:15)	HCCl_3 -MeOH (2:1)
Glykolipide	HCCl_3 -MeOH (2:1)	HCCl_3 -MeOH- H_2O (65:25:4)	HCCl_3 -MeOH- H_2O (60:30:4,5)
Phospho- lipide	HCCl_3 -MeOH- H_2O (60:30:4,5)	HCCl_3 -MeOH- H_2O (65:25:4)	HCCl_3 -MeOH- H_2O (60:30:4,5)
Isoprenoide Chinone	HCCl_3	K.: Hexan-Ether (85:15) RP: Aceton- H_2O (98:2)	HCCl_3

K. = Kieselgel 60 HPTLC-Platten; RP = RP-18 HPTLC-Platten.

Die hydrophoben Grundkörper, die Glyko- und Phospholipide wurden preparativ aufgetrennt mittels vertikaler DC auf 20x20 cm DC-Platten auf Glas (Kieselgel 60, F_{254} , 0,5 mm Schichtdicke, Merck), die durch Entwickeln in Methanol vorgereinigt waren. Etwa 5-10 mg Lipidmaterial wurden

gelöst, mit einem Membranfilter von Schwebeteilchen befreit und mit Hilfe eines automatischen Probenauftragegerätes auf die Platten gesprüht. Nach dem Entwickeln wurden die Platten in 5 Teile geschnitten. Die beiden Randstreifen und den Mittelstreifen bespruhte man mit methanolischer Schwefelsäure und kratzte die entsprechenden Substanzzonen auf den beiden nicht gefärbten Plattenteilen aus. Die Lipide wurden mehrmals mit geeigneten Lösungsmitteln extrahiert. Restliches kolloidales Kieselgel wurde durch Ausschütteln der Extrakte mit Wasser abgetrennt.

Jeweils ca. 1 mg isoprenoide Chinone wurden durch präparative DC mit den oben beschriebenen HPTLC-Platten isoliert. Die Kieselgel 60 Platten waren durch Entwickeln mit Methanol, die RP-18 Platten durch Entwickeln mit Chloroform gereinigt worden.

7. Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC-Trennungen wurden mit einem Gerät von Laboratory Data Control (Riviera Beach, Fl. USA), ausgestattet mit 2 constametric II Pumpen, einem Gradientenmischer und einem UV II Spektrometer mit variabler Wellenlängeneinstellung, durchgeführt.

7.1 Trennung der Tetraether

Das Gemisch der homologen Tetraether wurde, nach Derivatisierung mit p-Nitrobenzoylchlorid, mit präparativer DC auf HPTLC-Kieselgel 60 Platten und dem Laufmittel Chloroform/Ethylacetat 85:15 vorgereinigt und auf einer μ Porasil-Säule (3,9x300 mm, 10 μ m, Waters) isokratisch mit Methylenchlorid/Aceton 997:3, bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,7 ml/min, präparativ aufgetrennt. Aus den Flächen der bei 254 nm registrierten Peaks wurde das Mengenverhältnis der einzelnen Tetraether ermittelt.

Veresterung der Tetraether mit p-Nitrobenzoylchlorid (40):

Man setzte 1 mg Material in 0,2 ml trockenem Pyridin mit 6 mg p-Nitrobenzoylchlorid in einem Reacti vial (Pierce) 24 h bei 90 °C um. Dann wurde 1 Tropfen Wasser zugegeben, weitere 5 min erhitzt, das Pyridin mit Stickstoff abgeblasen, und der Rückstand zwischen Chloroform und Wasser verteilt. Die organische Phase wurde nacheinander mit 0,1N Salzsäure, 0,1N Natronlauge, gesättigter Kochsalzlösung und Wasser gewaschen.

Verseifung der p-Nitrobenzoyl ester (41):

0,1 mg p-Nitrobenzoyl ester wurden in einem Druckreagenzglas 2 h mit 2 ml 2N Kalilauge bei 100 °C verseift. Nach Zugabe von 1 ml Wasser wurde die wässrige Lösung mehrmals mit Hexan ausgeschüttelt.

7.2 Trennung der isoprenoiden Chinone

Die chinonhaltigen Fraktionen der Kieselgel DC wurden präparativ auf einer Spherisorb RP-18 Säule (5 µm, Separation Science) isokratisch mit Methanol/Methylenchlorid 9:1 bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min aufgetrennt (42); detektiert wurde bei 270 nm.

Die Mengenverhältnisse der einzelnen Chinone wurden mit analytischer HPLC abgeschätzt. Die Gesamtchinonfraktion wurde zu diesem Zweck auf der oben beschriebenen Säule mit einem 30-Minuten-Gradienten von 1-15% Methylenchlorid in Methanol analysiert. Die Chinone wurden in drei HPLC-Läufen bei 270, 320 und 455 nm detektiert.

8. Chemische Abbaureaktionen

8.1 Hydrolysen

Die Partialhydrolyse von 0,5 mg Glykolipid wurde 15 h mit 0,07N methanolischer Salzsäure in einem Reacti vial (Pierce) bei 60 °C durchgeführt (36). Die hydrophoben Reaktionsprodukte gewann man durch Verteilen des Gemisches zwischen Chloroform und Wasser.

Die Hydrolyse mit 2-5 ml 1N methanolischer Salzsäure führte man in einem Ampullenreagenzglas mit 1-35 mg trockener Probe 16 h bei 100 °C durch (34). Das Reaktionsgemisch wurde mit 2 Volumenteilen Wasser versetzt und 3x mit Hexan/Ethylacetat 1:1 ausgeschüttelt.

Bei der drastischen Hydrolyse mit 2 ml 6N wässriger Salzsäure wurden 2 mg Lipid 72 h bei 105 °C in einem Ampullenreagenzglas abgebaut (36). Das Reaktionsgemisch verteilte man zwischen Chloroform und Wasser.

Die alkalische Hydrolyse erfolgte durch dreistündige Reaktion von 0,25 mg Phospholipid bei 105° C mit 0,2 ml 1N Natronlauge in einem Reacti vial (36). Das Produktgemisch wurde mit 0,2N Salzsäure neutralisiert und nach Zugabe von Wasser mit Chloroform ausgeschüttelt.

8.2 Etherspaltungen

0,5-5 mg Lipidmaterial wurden in ein Druckreagenzglas überführt, nach Abblasen des Lösungsmittels im Vakuum getrocknet und mit 3 ml 1M Bortrichlorid in Methylenchlorid (Aldrich) 16 h bei Raumtemperatur umgesetzt (34). Überschüssiges Bortrichlorid und Methylenchlorid wurden abgeblasen, die Borsäure als flüchtiger Methylester durch mehrmaliges Aufnehmen in Methanol und anschließendes Abblasen entfernt. Das Produktgemisch verteilte man zwischen Wasser und Hexan/Ethylacetat 1:1.

Die Etherspaltung mit 2 ml 57%iger wässriger Jodwasserstoff-

säure führte man mit 0,01-1 mg Substanz in einer Glasampulle 24 h bei 130° C durch (34). Die wässrige Lösung wurde 3x mit Hexan/Ethylacetat 1:1 ausgeschüttelt. Die vereinten organischen Phasen wurden nacheinander mit 10%iger Kochsalz-, gesättigter Kaliumcarbonat-, 50%iger Natriumthiosulfatlösung und Wasser gewaschen.

8.3 Reduktionen

Die Alkyljodide aus der Spaltung mit Jodwasserstoff (0,01-1 mg) wurden in einem Druckreagenzglas mit 100 mg Zinkstaub und 1-2 ml Essigsäure unter Rühren bei 100 °C reduziert (34). Das Produktgemisch wurde mit Natriumcarbonat neutralisiert, mit 1 ml Wasser versetzt und 3x mit Hexan ausgeschüttelt. Die vereinten Hexanphasen wurden mit 10%iger Natriumcarbonatlösung und Wasser gewaschen.

Die gleichen Bedingungen galten für die Reduktion mit Zink und Deuteroessigsäure.

9. GC- und GC/MS-Analysen

Die Gaschromatogramme wurden mit einem Fractovap 2101AC von Carlo Erba mit Temperaturprogrammierung und Flammenionisationsdetektor aufgenommen. Die GC/MS-Analyse führte man mit dem gleichen Gaschromatographen und dem Massenspektrometer CH7A, Varian MAT durch. Man benutzte in beiden Fällen Quarzkapillarsäulen. Trägergas bei der GC-Analyse war Wasserstoff, bei der GC/MS-Analyse Helium. In Tabelle 2 sind die Trennbedingungen für die verschiedenen Lipidfraktionen angegeben.

Tabelle 2: Trennbedingungen bei der Gaschromatographie.

	Säule	Detektor-, Injektor- temperatur	Temperatur- programm
Organische Phasen der 1N MeOH/HCl und BCl ₃ Spaltungen	DB1 (30m)	250°C	100-280°C 3°C/min
Organische Phasen der Zn/Essigsäure Reduktionen	Cp ^t mSIL5 (10m)	330°C	150-310°C 5°C/min
Wässrige Phasen der 1N MeOH/HCl, 6N H ₂ O/HCl und BCl ₃ Spaltungen*	DB1701 (25m)	250°C	60-280°C 4°C/min
Diether nach Perfluor- propionylierung	Cp ^t mSIL5 (10m)	350°C	300°C isotherm

* nach Trimethylsilylierung

DB1 und DB1701 Säulen: J.W. Scientific Inc., Rancho Cordova, CA, USA; Cp^tmSIL5-Säule: Chrompack, Middelburg, NL.

Die organischen Phasen aus der Hydrolyse mit methanolischer Salzsäure, der Spaltung mit Bortrichlorid und der Reduktion mit Zink/Essigsäure wurden underivatisiert untersucht.

Die wässrigen Phasen aus den chemischen Abbaureaktionen engte man unter Zusatz von Ethanol ein, nahm sie in Methanol auf und überführte sie in MIFL-Gläser (Antech, Bad Dürkheim). Die trockenen Proben (maximal 0,5 mg Lipid) versetzte man mit 20 µl Silyl 2110 (WGA, Darmstadt), einer

Mischung aus Hexamethyldisilazan und Trimethylchlorsilan in Pyridin, schüttelte, zentrifugierte nach 10 min den entstandenen Niederschlag ab und injizierte vom Überstand unmittelbar danach in den Gaschromatographen.

Die Derivatisierung von etwa 0,1 mg trockenem Diether erfolgte in einem Reacti vial mit 50 μ l Methylenchlorid und 50 μ l Perfluorpropionsäureanhydrid. Nach intensivem Schütteln und 1 h Stehenlassen bei Raumtemperatur wurden Perfluorpropionsäureanhydrid und Methylenchlorid abgelassen: der Rückstand wurde in Methylenchlorid aufgenommen und mit GC analysiert.

Quantitative Bestimmung der C₄₀-Kohlenwasserstoffe:

0,25 mg Tetraethergemisch wurden mit der Standardsubstanz n-Hexatriacontan versetzt. Durch Spaltung mit Jodwasserstoff und Reduktion mit Zink/Essigsäure setzte man die C₄₀-Kohlenwasserstoffe frei, deren Peakflächen nach Trennung im GC mit dem Integrator SP4270 (Spectra-Physics) bestimmt wurden.

Quantitative Abschätzung von Phytanylchlorid und der Fettsäuren:

Unter gleichen Bedingungen nahm man Chromatogramme der organischen Phasen der Hydrolyse mit methanolischer Salzsäure bzw. der Etherspaltung mit Bortrichlorid und einer externen Standardsubstanz (Stearinsäuremethylester bzw. Dioctylphthalat) auf und gelangte durch Vergleich der Peakflächen zu Absolutkonzentrationen.

10. Quantitative Zuckerbestimmung

0,5 mg Glykolipide und die Standardsubstanz Xylose wurden mit 1N methanolischer Salzsäure 16 h bei 80 °C in einem Druckreagenzglas hydrolysiert, zur Trockne gebracht und weitere 13 h mit 0,5N wässriger Salzsäure bei 100 °C gespalten.

0,5 mg Phosphoglykolipide und der Standard Xylose wurden 20 h bei 100 °C mit 0,5N wässriger Salzsäure in einem Ampullenreagenzglas hydrolysiert.

Die Reaktionsprodukte der Hydrolyseansätze wurden zwischen Chloroform und Wasser verteilt. Die wässrigen Phasen wurden eingeeengt, in 1 ml Wasser aufgenommen, mit 2 Tropfen 1N Natronlauge alkalisch gemacht, in Rundkolbchen mit 0,3 mg NaBH_4 in 50 μl Wasser versetzt und 6 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Man sauerte mit 1 Tropfen konzentrierter Salzsäure an, engte die Lösung ein und nahm den Rückstand mehrmals in Methanol auf. Nach Trocknen über P_2O_5 wurde die Substanz in 1 ml Acetanhydrid/Pyridin 1:1 aufgenommen und 30 min unter Rühren bei 100 °C gehalten. Das Produktgemisch wurde eingeeengt, 2x in Toluol aufgenommen und getrocknet.

Die Alditolacetate wurden durch GC auf einer 30 m OV 1701 Kapillarsäule (Temperaturprogramm: 2 min bei 170 °C, dann 3 °C/min Heizrate) getrennt und durch MIS-Detektion der Masse 289 quantifiziert. Die relativen Wiederfindungsfaktoren der einzelnen Zucker wurden bestimmt, indem man ein Standardgemisch der Zucker einmal mit und einmal ohne Anwendung der Hydrolysebedingungen in die Alditolacetate überführte und mit GC/MIS analysierte. Die Aufarbeitungsverluste wurden durch Analyse von 1-O- α -Methylglucosid abgeschätzt.

11. Methylierungsanalyse (43)

Herstellung von Dimethylsulfinylnatrium in DMSO:

100 mg mit Hexan gewaschenes Natriumhydrid wurden in einem Schliffzentrifugenglas mit 2 ml über Calciumhydrid destilliertem DMSO versetzt. Das Gemisch ließ man etwa 15 min bis zur Beendigung der Gasentwicklung unter Rühren und Argondurchfluß bei 90 °C reagieren. Der entstehende Niederschlag wurde abzentrifugiert.

2 mg Glyko- bzw. Phosphoglykolipid wurden in einem Reaktionsvial in 300 µl trockenem DMSO durch Ultraschallbehandlung gelöst und mit 200 µl der oben beschriebenen Lösung von Dimethylsulfinylnatrium in DMSO 10 min im Ultraschallbad und 50 min am Magnetruhrer deprotoniert (44). Bei der Zugabe der DMSO-Natrium-Lösung überblies man das Reaktionsvial mit Argon. Um zu prüfen, ob während der Methylierung ein Überschuß der starken Base vorlag, wurde Triphenylmethan mit einem Tropfen des Reaktionsgemisches versetzt (45). Die Probe wurde mit 200 µl Methyljodid 10 min im Ultraschallbad und 50 min am Magnetruhrer umgesetzt, mit Wasser versetzt und 3x mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Die vereinigten Methylenchloridphasen extrahierte man 10x mit Wasser, um restliches DMSO zu entfernen. Die permethylierten Lipide wurden, wie bei der quantitativen Zuckerbestimmung beschrieben, hydrolysiert, reduziert und acetyliert.

Die partiell methylierten Alditolacetate wurden mittels GC/MS identifiziert (OV 1701 Kapillarsäule, 25 m, Temperaturprogramm: 100 °C mit 3 °C/min Heizrate).

12. Quantitative Glycerinbestimmung

0,5 mg Tetraethergemisch wurden mit Bortrichlorid gespalten (s. Kapitel II.8.2). Die wässrige Phase brachte man zur Trockne. Der Rückstand wurde in einem definierten Volumen Wasser aufgenommen und ein Aliquot für die enzymatische Analyse mit der Test-Combination für die Lebensmittelanalytik von Boehringer (Mannheim) eingesetzt. Glycerin wurde dabei mit ATP und Glycerokinase phosphoryliert (46). Entstandenes ADP wurde mittels Pyruvat-Kinase durch Phosphoenolpyruvat unter Bildung von Pyruvat wieder in ATP überführt. Das Pyruvat wurde dann durch NADH in Gegenwart von Lactat-Dehydrogenase zu Lactat reduziert. Die Abnahme der Extinktion durch das entstehende NAD wurde bei 334 nm gemessen. Zur Berechnung des Wiederfindungsfaktors führte man einen Parallelansatz mit D,L-Batylalkohol (Aldrich) durch.

13. Quantitative Phosphatbestimmung

100 µg Phospholipid wurden für die quantitative Phosphatbestimmung mit den Reagenzien von Serva nach Eibl und Lands (47, 48) eingesetzt. Nach der Freisetzung des organisch gebundenen Phosphats wurde dessen Gehalt nach Reaktion mit Ammoniummolybdat photometrisch bei 660 nm durch Vergleich mit einer Eichkurve bestimmt. Außerdem wurde der für Fructose-1,6-diphosphat (Boehringer, Mannheim) ermittelte Wiederfindungsfaktor von 90% berücksichtigt.

14. Spektroskopische Methoden

- IR-Spektren wurden mit dem IR-Gerat 197, Perkin Elmer (D-7770 Ueberlingen) aufgenommen. Dazu wurden etwa 1 mg Tetraethergemisch zwischen 2 Kochsalzplatten gebracht.
- Den optischen Drehwert von ca. 10 mg Tetraethergemisch in Chloroform bestimmte man mit dem Polarimeter 241MC von Perkin Elmer.
- Die ^1H -NMR-Spektren wurden mit 90 und 500 MHz Spektrometern von Bruker (D-7512 Rheinstetten-Forchheim) aufgenommen. Die Tetraether, die Glyko- und Phospholipide wurden in Deuteropyridin und einem Tropfen D_2O gelöst, die isoprenoiden Chinone in CDCl_3 und einem Tropfen D_2O . Als Standardsubstanz diente Tetramethylsilan.
- Die ^{13}C -NMR-Spektren wurden bei 23,63 MHz mit einem Gerat von Bruker registriert. Die Tetraether und Glykolipid A löste man in DCCl_3 , Phospholipid C in $\text{D}_3\text{COD}/\text{DCCl}_3/\text{D}_2\text{O}$ 60:30:4.
- Die Massenspektren registrierte man mit den Massenspektrometern CH7A und MAT312 mit dem Datensystem SS 200/MS, Varian/Finnigan (2800 Bremen 10).
- Die UV-Spektren der isoprenoiden Chinone, gelöst in n-Hexan, wurden mit dem Spektrophotometer UV Lambda 5, Perkin Elmer, aufgenommen.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1. Glycerolipide aus *Thermoproteus tenax*

Thermoproteus tenax, Stamm Kra 1, (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen 2078), ein stabchenförmiges, schwefelabhängiges Archaeobakterium, wurde von Zillig et al. in heißen vulkanischen Quellen in Krafla, Island, entdeckt (26). Der Organismus wächst anaerob, optimal bei 88 °C und pH 5,4, besitzt eine starre Zellhülle aus Proteinen (26) und enthält, gemäß einer einführenden Analyse, typisch archaeobakterielle Lipide (49).

Inhalt dieser Arbeit war die Untersuchung von Membranlipiden. Zu diesem Zweck extrahierte man die gesamten Zellen, ohne die Cytoplasmamembran zu isolieren (36). Dieses Vorgehen war sinnvoll, denn die Lipide in Eubakterien und Archaeobakterien kommen fast ausschließlich in der Cytoplasmamembran vor; Triglyceride als Speichersubstanzen wurden in Archaeobakterien noch nicht gefunden (3), bei Eubakterien nur in einigen Mycoplasmen (50, 51).

1.1 Isolierung und Fraktionierung der Lipide

Die Lipide von *Thermoproteus tenax* bestehen aus einem komplexen Gemisch von Komponenten unterschiedlicher Polarität. Durch saulenchromatographische Methoden ließen sich die Lipide in drei Lipidfraktionen auftrennen.

Die Neutrallipid(NL)-, Glykolipid(GL)- und Phospholipid(PL)-Fraktionen aus autotroph bzw. heterotroph gezogenen Zellen wurden in Anlehnung an das Verfahren von Langworthy (34) gewonnen (Abb. 4).

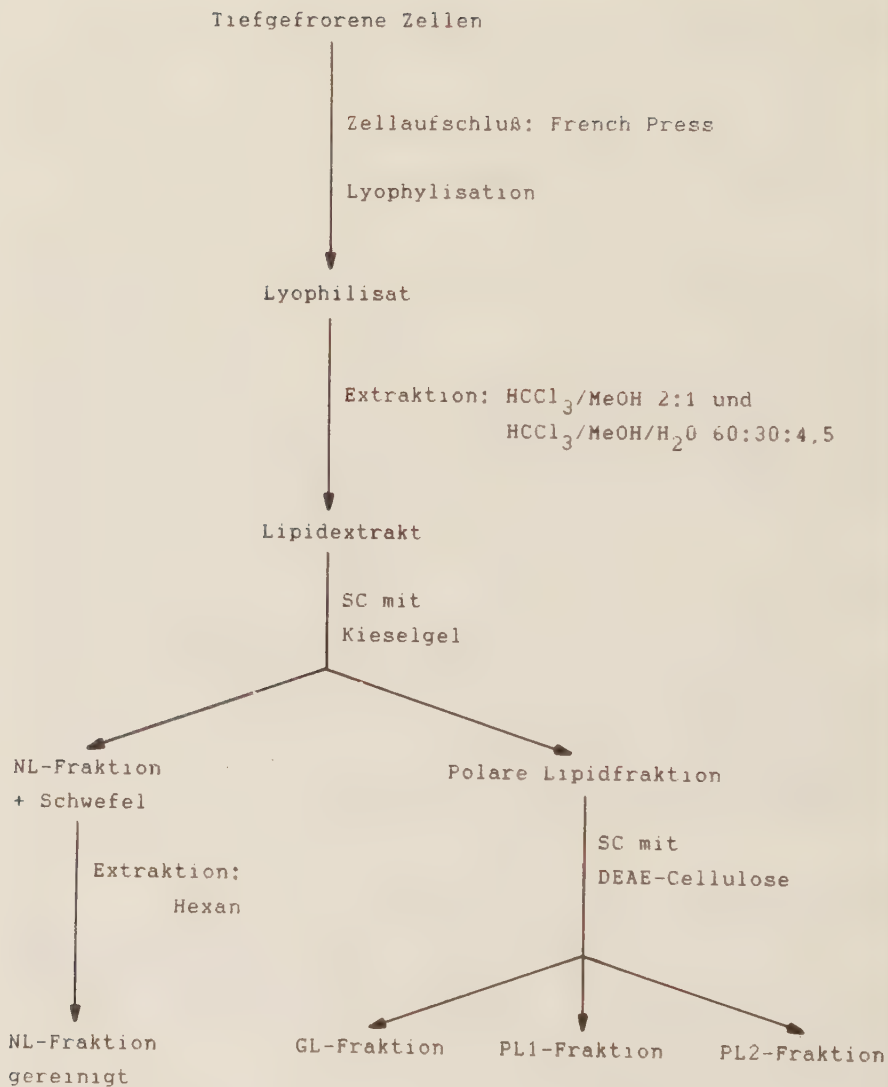


Abb. 4. Gewinnung der Lipidfraktionen aus *Thermoproteus tenax*

Die Bakterien wurden mit einer French Press zerkleinert, um die Ausbeute an Lipiden zu erhöhen. Die anschließende Lyophilisation diente dazu, definierte Ausgangsbedingungen für die Lipidextraktion zu erreichen und einen Bezugspunkt für quantitative Aussagen zu erhalten. Die Lipide wurden mit Chloroform-Methanol (2:1) unter Rühren extrahiert. Die Ausbeute an den stärker polaren Lipiden ließ sich durch anschließendes Rühren mit Chloroform/Methanol/Wasser 60:30:4,5 erhöhen. Auf einer Kieselgelsäule trennte man den Lipidextrakt in eine NL-Fraktion und eine Fraktion polarer Glyko- und Phospholipide. Der Lipidextrakt enthielt wechselnde Mengen elementaren Schwefels, der aus dem Kulturmedium stammte; er gelangte bei der Fraktionierung der Lipide in die NL-Fraktion. Da Schwefel in Hexan schlechter löslich ist als die Neutrallipide, konnten letztere durch mehrmalige Hexanextraktion angereichert werden. Die polaren Lipide wurden durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose in nicht-ionische Glykolipide und ionische Phospholipide aufgetrennt. Der in der Literatur (34) beschriebene basische Ammoniak-Puffer löste nur die weniger polaren Phospholipide von der Säule (PL1-Fraktion); ein saurer Puffer mit Kaliumhydrogenphthalat eluierte die stärker polaren Phospholipide (PL2-Fraktion).

Die analytische Dünnschichtchromatographie (Abb. 5) der erhaltenen Fraktionen zeigt, daß die Trennung der Lipide in die NL-, GL- und PL-Fraktionen gelungen ist. Die Lipide wurden mit dem unspezifischen Sprühreagens Methanol/Schwefelsäure 1:1 detektiert. Die Neutrallipide besitzen die größten R_F -Werte (0,8-1). Die R_F -Werte einzelner Glyko- und Phospholipide sind gleich (GLE und PLB bzw. GLF und PLC), doch ausschließlich die Phospholipide lassen sich mit dem Molybdänblau-Sprühreagens detektieren.

Die Glyko- bzw. Phospholipide, die mit dem Laufmittelsystem Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 im Gegensatz zu den Neutrallipiden gut aufgetrennt werden, zeigen bei autotroph und heterotroph gezogenem Zellmaterial jeweils das gleiche Bandenmuster.

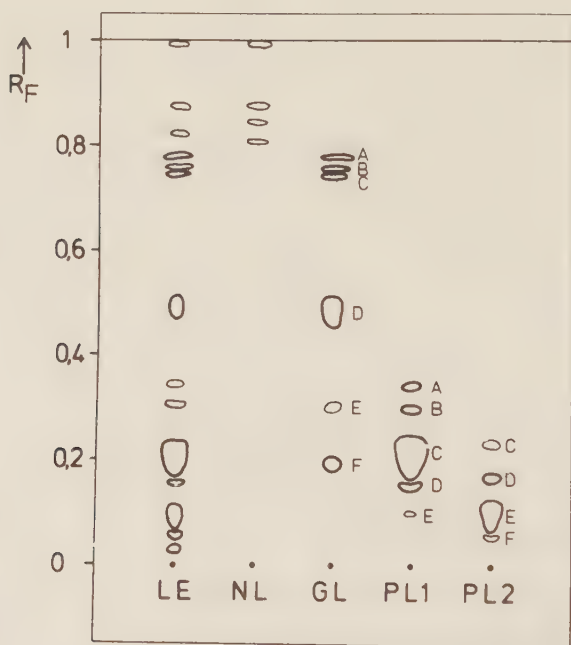


Abb.5. Dunnschichtchromatogramm auf Kieselgel von den Lipidfraktionen aus *Thermoproteus tenax*.

Laufmittel: $\text{HCCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 65:25:4; Detektion: $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ 1:1; LE: Lipidextrakt; NL: Neutrallipid-Fraktion; GL: Glykolipid-Fraktion; PL: Phospholipid-Fraktion.

Neben den Lipiden wurde, wie oben erwähnt, Schwefel extrahiert. Der Schwefel gelangte in die NL-Fraktion und verfälschte die Gewichtsbilanz. Bei einer Aufarbeitung trennte man deshalb in einem Sucrosegradienten die Zellen bzw. Zellfragmente ohne Schwefelpartikel von den schwereren Zellen, an deren Oberfläche Schwefelkörner adsorbiert waren. Aus den Zellen ohne Schwefelpartikel wurden die Lipide extrahiert und in NL-, GL- und PL-Fraktionen aufgetrennt. Der Gesamtlipidgehalt beträgt etwa 6% des Lyophilisats und liegt damit höher als die für andere schwefelabhängige Archaeobakterien gefundenen Werte von 2-4% (3). Die Lipide bestehen in autotroph und in heterotroph gezogenen Zellen aus 5% Neutrallipiden, 20% Glyko- und 75% Phospholipiden (65% PL1- und 10% PL2-Fraktion). *Thermoproteus tenax* enthält, wie die meisten Archaeobakterien, wenig Neutrallipide und überwiegend Phospholipide (3, 15).

1.2 Bausteinanalyse der Lipidfraktionen

In Archaeobakterien wurden bisher neben polaren Etherlipiden isoprenoide Kohlenwasserstoffe, Carotinoide, Alkylbenzole und isoprenoide Chinone gefunden (3). Das Vorkommen von Fettsäuren in Archaeobakterien ist umstritten (s. Einleitung).

Bei der Untersuchung der Lipide von *Thermoproteus tenax* ging man davon aus, daß Etherlipide und/oder Fettsäureesterlipide vorlagen. Der gesamte Lipidextrakt, die NL-, GL- und PL-Fraktionen aus autotroph gezogenen Bakterien wurden jeweils gleichen chemischen Abbaureaktionen (Abb. 6) unterworfen, um zu klären, ob Ether- oder Esterlipide vorhanden sind und welche hydrophilen Komponenten daran gebunden sind.

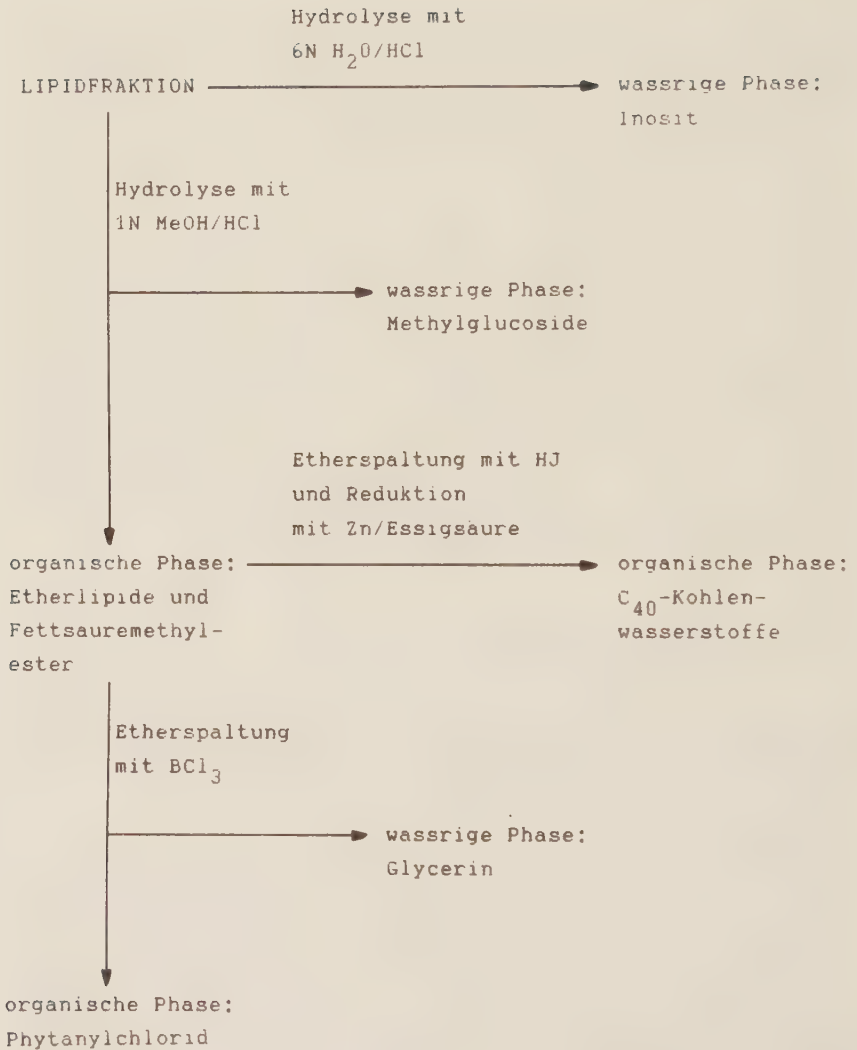


Abb. 6. Chemische Abbaureaktionen mit den Lipidfraktionen von *Thermoproteus tenax*.

Mit 1N methanolischer Salzsäure hydrolysierte man die polaren Reste der komplexen Lipide ab und verseifte Esterbindungen. Die eventuell entstandenen Methylglykoside und die Fettsäuremethylester analysierte man mit GC/MS. Durch Etherspaltung mit Bortrichlorid bzw. Jodwasserstoffsäure werden die Etherlipide in kleinere, für die GC/MS-Analyse geeignete Bruchstücke überführt. Bortrichlorid setzt aus den Etherlipiden Polyole und Alkylchloride frei. Da die Alkylchloride der C_{40} -Kohlenwasserstoffe bei den für die Trennung erforderlichen hohen Temperaturen im Gaschromatographen HCl abspalten, untersuchte man mit dieser Methode nur Phytanylchlorid aus dem Diether. Jodwasserstoffsäure erzeugt aus den Etherlipiden Alkyljodide, die mit Zink/Essigsäure zu stabilen, chromatographierbaren Kohlenwasserstoffen reduziert werden. Zusätzlich zur Hydrolyse mit 1N Salzsäure wurde eine drastische Hydrolyse mit 6N wässriger Salzsäure durchgeführt, um eventuell vorhandene Polyolphosphatbindungen zu spalten.

1.2.1 Fettsäuremethylester

In der organischen Phase des Salzsäurehydrolysats wurde nach Fettsäuren gesucht. Die Acylreste von Triglyceriden bzw. von polaren Esterlipiden sollten durch Methanolyse in die entsprechenden Fettsäuremethylester überführt werden. Man arbeitete mit autotroph gezogenen Zellen, weil bei heterotrophen Kulturen Hefeextrakt zugesetzt werden muß. Im Hydrolysat von Hefeextrakt wurden jedoch einige Fettsäuren, u.a. Palmitinsäure und Ölsäure nachgewiesen (49).

Da Fettsäuren, Weichmacher und einige Kohlenwasserstoffe häufig als Verunreinigungen bei Lipidanalysen auftreten (52), wurde ein Leeransatz durchgeführt: parallel zur Aufarbeitung der Lipide wurde eine entsprechende Menge bidestillierten Wassers durch eine French Press geschickt, lyophilisiert, mit organischen Lösungsmitteln extrahiert,

chromatographiert und hydrolytisch abgebaut, bis man die entsprechenden Leerproben des Lipidextraktes, der NL-, GL- und PL-Fractionen und ihrer chemischen Abbauprodukte erhalten hatte. Die Proben von *Thermoproteus tenax* und des Leeransatzes wurden mittels GC und GC/MS analysiert.

Im Lipidextrakt und in der NL-Fraktion aus dem Archaeobakterium fand man die Weichmachersubstanz Dioctylphthalat, geringe Mengen an Stearinsäure- und Palmitinsäuremethylester und Kohlenwasserstoffe. Diese Substanzen waren in geringerer Menge auch in den Leeransätzen enthalten; so fand man von Dioctylphthalat ca. 1/50, von den Fettsäuren etwa 1/5 der aus *Thermoproteus tenax* isolierten Mengen. Die GL- und PL-Fractionen enthielten ebenfalls die oben beschriebenen Substanzen.

In der organischen Phase des Salzsäurehydrolysats der Lipidfraktionen von *Thermoproteus tenax* wurden mittels GC/MS nur Dioctylphthalat, einige Fettsäuremethylester und Kohlenwasserstoffe, also typische Verunreinigungssubstanzen, gefunden. Da auch die Leeransätze diese Verbindungen enthalten, müssen sie Artefakte sein. Mit dem Leeransatz wurde die Bakterienzucht, bei der der Kontakt mit Kunststoffen am intensivsten und sauberes Arbeiten im Sinne organisch-chemischer Analytik am wenigsten möglich war, nicht simuliert. Deshalb enthielten die Leeransätze des Lipidrohextraktes und der NL-Fraktion weniger Fettsäuren und Dioctylphthalat als die Proben des Archaeobakteriums. Wenn *Thermoproteus tenax* polare Membranesterlipide wie die übrigen Eubakterien besäße, wären sie bei der Lipidfraktionierung in die GL- bzw. PL-Fraktion gelangt; doch gerade in diesen Fraktionen stimmten die Proben aus Archaeobakterium und Leeransatz qualitativ und quantitativ überein. Nach diesen Ergebnissen enthält autotroph gezogenes Material von *Thermoproteus tenax* keine Fettsäuren.

1.2.2 Phytanylchlorid

2,3-Di-O-phytanyl-sn-glycerin (Abb. 1B) ist der dominierende hydrophobe Grundkörper der Lipide in Halobakterien (3, 15). Bei der Spaltung mit Bortrichlorid entsteht aus den etherartig an Glycerin gebundenen Kohlenwasserstoffen Phytanylchlorid, das durch GC/MS identifiziert werden kann. Die Gaschromatogramme der organischen Phasen der BCl_3 -Spaltungen der NL-, GL- und PL-Fractionen aus *Thermoproteus tenax* zeigten neben Komponenten, die auch im Leeransatz vorhanden waren, als Hauptkomponente Phytanylchlorid und in geringer Menge isoprenoide Kohlenwasserstoffe $\text{C}_{20}\text{H}_{40}$, die durch thermische HCl -Abspaltung aus Phytanylchlorid, vermutlich im Injektor des Gaschromatographen, entstanden. Das Massenspektrum von Phytanylchlorid aus *Thermoproteus tenax* (Abb. 7) ist identisch mit dem aus Phytol hergestellten Produkt (49).

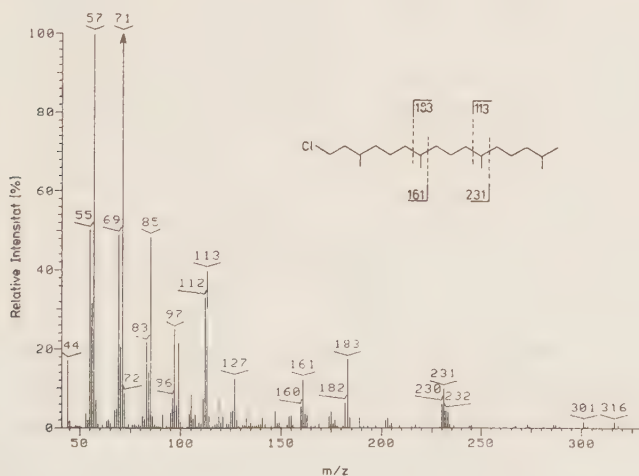


Abb. 7. Massenspektrum von Phytanylchlorid, M_r 316.

Die Bruchstücke m/z 113 und 183 und die im Isotopenverhältnis 3:1 auftretenden Ionen m/z 161/163 und 231/233 entstehen durch bevorzugte Bindungsbrüche an den Methylverzweigungen. Sie bestätigen gemeinsam mit dem Molekulation m/z 316 die Struktur des isoprenoiden Molekuls. Nach der quantitativen Abschätzung durch Gaschromatographie beträgt die Menge an Phytanylchlorid etwa 5% der Menge der C_{40} -Kohlenwasserstoffe (s. Kapitel III.1.2.3).

1.2.3 C_{40} -Kohlenwasserstoffe

Glycerin-tetraether (Abb. 1C,D) sind nach bisherigen Untersuchungen die Hauptkomponenten der hydrophoben Grundkörper in schwefelabhängigen Archaeobakterien (3, 15). Zur Charakterisierung der Alkylgruppen spaltet man die Etherbindungen mit Jodwasserstoff und erhält aus den Alkyljodiden durch Reduktion mit Zink/Essigsäure gaschromatographierbare C_{40} -Kohlenwasserstoffe.

Die GC/MS-Analyse der NL-, GL- und PL-Fractionen aus *Thermoproteus tenax* zeigte das Vorkommen der C_{40} -Kohlenwasserstoffe $C_{40}H_{82}$, $C_{40}H_{80}$, $C_{40}H_{78}$ und von Spuren $C_{40}H_{76}$ (Abb. 8-10). Es handelt sich dabei um perhydrierte Kohlenwasserstoffe aus acht isoprenoiden C_5 -Einheiten, die in der Mitte "Kopf-Kopf" verknüpft sind und 0-3 Cyclopentanringe enthalten. Die MS-Daten stimmen mit den Angaben von De Rosa et al. überein, die die Strukturen dieser Kohlenwasserstoffe aufgeklärt hatten (19, 53, 54).

Das Massenspektrum des gesättigten acyclischen Kohlenwasserstoffs $C_{40}H_{82}$ (Abb. 8) zeigt das Molekulation bei m/z 562 und die für gesättigte Kohlenwasserstoffe typischen Ionen von m/z 57, 71, 85 bis m/z 435 mit abnehmender Intensität. Durch bevorzugte Bindungsbrüche in α -Stellung zu den Methylseitengruppen entstehen energetisch stabilere Kationen (sekundäre C-Atome), deren Signale höherer Intensität bei m/z 127, 197, 267, 323, 393 und 463 die Stellung der Methylverzweigungen

erkennen lassen. Neben diesen Fragmenten findet man Begleit-peaks höherer Intensität mit einer Masseneinheit weniger, die durch Protonentransfer aus den Primärfragmenten entstehen. Charakteristisch ist außerdem das Ion m/z 281, das durch β -Spaltung in der Mitte des Molekuls entsteht.

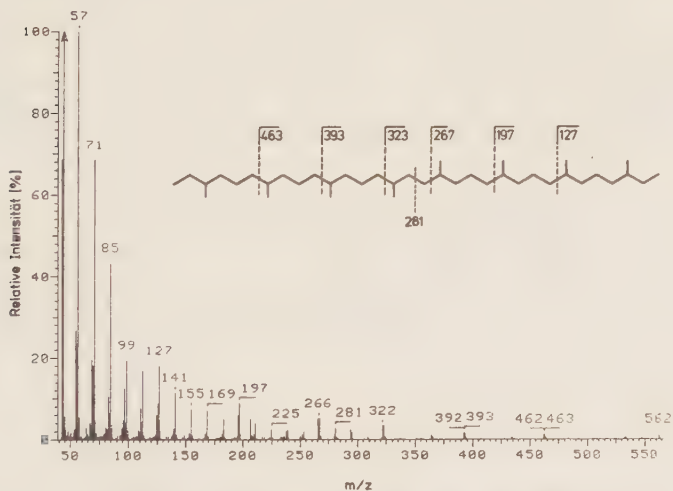


Abb. 8. Massenspektrum des Kohlenwasserstoffs Biphytan $C_{40}H_{82}$, M_r 562.

Das Massenspektrum des monocyclischen Kohlenwasserstoffs $C_{40}H_{80}$ ist vom gleichen Typ wie das oben beschriebene Spektrum. Der Kohlenwasserstoff besitzt ein Doppelbindungs-aquivalent: sein Molekulation m/z 560 und einige intensive Fragmentionen, die die Position der Methylverzweigungen anzeigen, sind um 2 Masseneinheiten nach niederen Massen verschoben. Die durch Bindungsbrüche neben dem Cyclopentanring entstehenden Ionen m/z 167/166, 195/194 und 393/392 (Abb. 9) ergeben intensivere Signale als die entsprechenden Ionen m/z 169, 197/196 und 393/392 des Kohlenwasserstoffs $C_{40}H_{82}$ (Abb. 8). Die Bindungsbrüche am Cyclopentanring sind

offensichtlich gegenüber den Fragmentierungen an den Methylverzweigungen bevorzugt.

Der bicyclische Kohlenwasserstoff $C_{40}H_{78}$ besitzt das Molekulation m/z 558 und weist somit zwei Doppelbindungsäquivalente auf. In Analogie zum Kohlenwasserstoff $C_{40}H_{80}$ sind die Signale der Ionen m/z 166/165, 195/194 und 391/390 (Abb. 9) intensiver als die entsprechenden Ionen im acyclischen Kohlenwasserstoff (Abb. 8). Das Ion m/z 291, das bei der Reduktion mit Zink/Deuteroessigsäure nicht verschoben wird, stammt aus dem Mittelteil der Alkylkette (s. Kapitel III.1.3.2.1c).

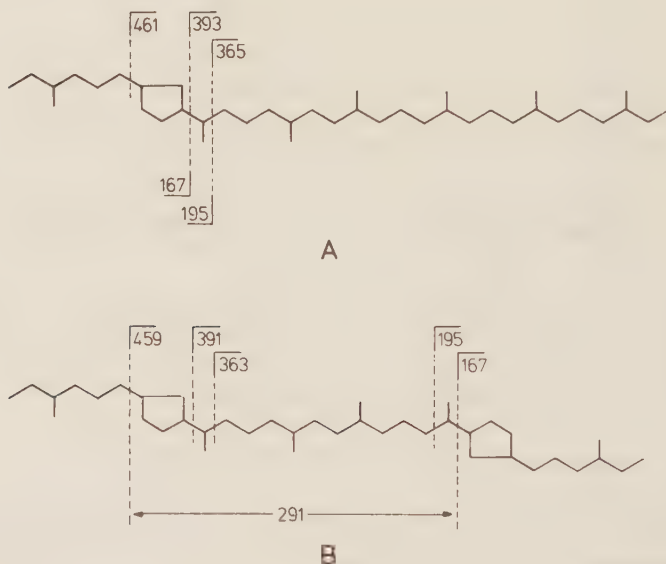


Abb. 9. Strukturen und Fragmentierung der Kohlenwasserstoffe A: $C_{40}H_{80}$, M_r 560 und B: $C_{40}H_{78}$, M_r 558.

Das tricyclische Alkan $C_{40}H_{76}$, M_r 556, (Abb. 10) besitzt drei Doppelbindungsäquivalente. Charakteristisch sind die intensiven Signale m/z 166-163, 195-192 und die Signale 291 und 391-388. Das Ion m/z 458, das durch Bindungsbruch zwischen den beiden benachbarten Cyclopentanringen entsteht, ist intensiver als die entsprechenden Signale in den anderen Kohlenwasserstoffen.

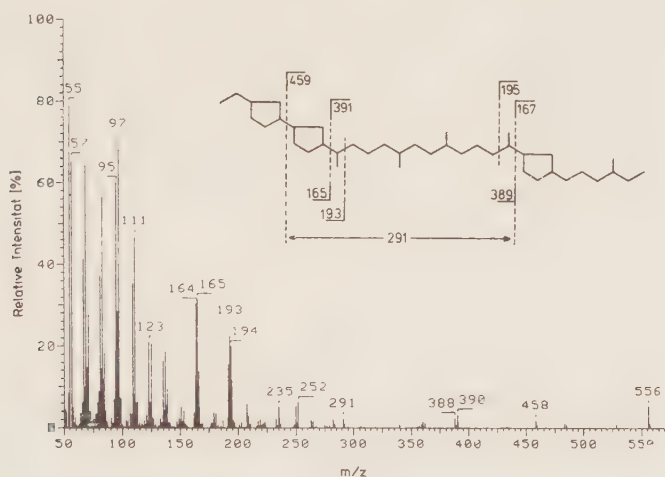


Abb. 10. Massenspektrum des Kohlenwasserstoffs $C_{40}H_{76}$, M_r 556.

Der Gesamtgehalt an C_{40} -Kohlenwasserstoffen in Thermoproteus tenax, der durch quantitative GC-Analyse mit n-Hexatriacontan als interner Standard bestimmt wurde, beträgt etwa 1,5% des Lyophilisats. Tabelle 3 zeigt die Verteilung der Kohlenwasserstoffe in den einzelnen Lipidfraktionen.

Tabelle 3: Mengenverhältnisse der C_{40} -Kohlenwasserstoffe in den Lipidfraktionen von *Thermoproteus tenax*.

	Kohlenwasserstoffe (%)			
	$C_{40}H_{82}$	$C_{40}H_{80}$	$C_{40}H_{78}$	$C_{40}H_{76}$
<i>Th. tenax</i> autotroph				
Lipidextrakt	46	25	29	<1
NL-Fraktion	68	20	12	<1
GL-Fraktion	67	18	15	<1
PL1-Fraktion	34	30	36	<1
PL2-Fraktion	65	20	15	<1
<i>Th. tenax</i> heterotroph				
Lipidextrakt	3	11	86	<1

Bei autotrophen Material kommen C_{40} -Kohlenwasserstoffe in allen Fraktionen vor, in der NL-Fraktion jedoch nur in geringer Menge. In der NL-, GL- und PL2-Fraktion dominiert der acyclische Kohlenwasserstoff, während in der PL1-Fraktion die Kohlenwasserstoffe $C_{40}H_{82}$, $C_{40}H_{80}$ und $C_{40}H_{78}$ in gleicher Menge enthalten sind.

Die Mengenverhältnisse der C_{40} -Kohlenwasserstoffe aus autotrophen Material unterscheiden sich deutlich von denen aus heterotroph gezogenen Zellen, in denen der bicyclische Kohlenwasserstoff $C_{40}H_{78}$ dominiert. Autotroph wachsende Zellen wurden mit Wasserstoff (H-Quelle) und Kohlendioxid (C-Quelle) begast, während heterotroph wachsende Zellen nur mit Kohlendioxid begast wurden und als H- bzw. C-Quellen Glucose und Hefeextrakt erhielten. Da die übrigen Wachstumsbedingungen gleich waren, sind offensichtlich die verschiedenartigen H- und C-Quellen für den unterschiedlichen Cyclisierungsgrad der Etherlipide verantwortlich.

1.2.4 Glucose

Die Lipide von Archaeobakterien und Eubakterien bestehen zum großen Teil aus polaren Lipiden (3). Die hydrophilen Bausteine dieser sogenannten komplexen Lipide sollten bei der Hydrolyse mit 1N methanolischer Salzsäure in die wässrige Phase gelangen.

Die wässrigen Phasen der NL-, GL-, PL1- und PL2- Fraktion wurden zur Trockne gebracht, trimethylsilyliert und mittels GC/MS untersucht (55). In der NL-Fraktion waren keine hydrophilen Komponenten vorhanden, während die GL-, PL1- und PL2-Fraktion jeweils Glucose als einzigen Kohlenhydratbaustein enthielten. Der Vergleich der GC-Retentionszeiten mit denen von Standardsubstanzen zeigte, daß ein Gemisch aus TMS- α - und TMS- β -Methylglucosid und wenig TMS-Glucosid vorlag.

1.2.5 Myo-Inosit

Die Phosphorsäuren von Phospholipiden sind häufig durch Esterbindungen mit den hydrophoben Grundkörpern und mit Polyolen, meistens Glycerin oder Inosit, verknüpft.

Die PL1- und PL2-Fraktion wurden einer drastischen Hydrolyse mit 6N wässriger Salzsäure unterworfen. In den wässrigen Phasen fand man nach Trimethylsilylierung bei der GC/MS-Analyse jeweils als einzige Komponente TMS-myo-Inosit (56). Die, wie oben gezeigt, ebenfalls vorhandene Glucose wird unter diesen Hydrolysebedingungen zersetzt.

1.2.6 Glycerin

Die Alkylketten, der in Archaeobakterien bisher gefundenen Diether und Tetraether sind etherartig an Glycerin und bei *Sulfolobus solfataricus* auch an ein Nonit gebunden (Abb. 1D). Diese oder andere Polyole sollten sich beim chemischen Abbau der Lipide in der wässrigen Phase der BCl_3 -Spaltung wiederfinden.

Nach Trimethylsilylierung der eingeengten wässrigen Phasen der BCl_3 -Spaltungen und gaschromatographischer Untersuchung fand man in allen Lipidfraktionen als einzige Komponente TMS-Glycerin.

1.3 Analyse der hydrophoben Grundkörper

Als Bausteine der hydrophoben Grundkörper der Lipide von *Thermoproteus tenax* wurden Glycerin und isoprenoide C_{20} - bzw. C_{40} -Kohlenwasserstoffe gefunden; aus den Hydrolysebedingungen ergibt sich, daß Glycerin und die Kohlenwasserstoffe etherartig miteinander verknüpft sind. Die Abwesenheit von Fettsäuren und damit von Fettsäureestern wurde gesichert. Nun mußte geprüft werden, ob die bekannten Diether- und Tetraetherstrukturen vorlagen und ob noch andere hydrophobe Grundkörper vorhanden waren.

Dazu wurden die Grundkörper aus den NL-, GL- und PL-Fraktionen durch Hydrolyse mit methanolischer Salzsäure hergestellt und mit DC untersucht (Abb. 11). Die GL-, PL1- und PL2-Fraktionen aus autotroph und heterotroph gezogenen Zellen ergeben ähnliche Chromatogramme, bestehend aus den Banden 1 bis 4. In den GL- und PL-Fraktionen dominiert jeweils das Bandenpaket 3, das in geringerer Menge auch in der NL-Fraktion auftritt. Die Bandenpakete 3 der verschiedenen Lipidfraktionen enthalten die einzelnen Komponenten jedoch in unterschiedlicher Menge. Diese Beobachtung läßt vermuten, daß die NL-, GL-, PL1 und PL2-Fraktionen strukturell ähnliche hydrophobe Grundkörper besitzen. Aus den PL1-Fraktionen von autotroph erhaltenem Material wurden die Banden 1, 2, 3 und 4 und aus heterotroph gezogenen Zellen die entsprechenden Banden 1, 2 und 3 (Abb. 11) in präparativem Maßstab isoliert, stellvertretend für die anderen Fraktionen. Man analysierte die Komponenten der Banden 1 und 3. Die Banden 2 und 4 konnten wegen der geringen Substanzmengen nicht charakterisiert werden.

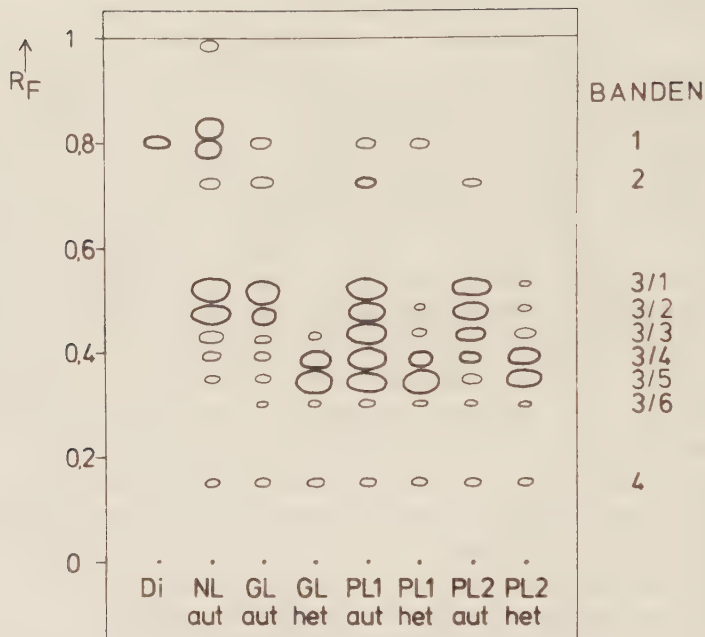


Abb. 11. Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel der organischen Phasen der MeOH/HCl-Hydrolysen der Lipidfraktionen aus *Thermoproteus tenax*.

Laufmittel: HCCl_3 /Ethylacetat 85:15; Detektion: H_2SO_4 /MeOH 1:1; Di: Glycerin-diether aus *Halobacterium halobium*; NL: Neutrallipid-Fraktion; GL: Glykolipid-Fraktion; PL: Phospholipid-Fraktion; aut: autotroph; het: heterotroph.

1.3.1 DC-Bande 1: Glycerin-diether

Die Analyse von Bande 1 aus autotrophem und heterotrophem Material zeigte, daß sie Diphytanylglycerin enthält (Abb. 11).

R_F -Daten aus der Literatur (34) wiesen auf eine Glycerin-diether Struktur hin. Deshalb wurde aus der Purpurmembran von

Halobacterium halobium gemäß Kates et al. 2,3-Di-O-phytanyl-sn-glycerin isoliert (57) (Abb. 1B). Die Substanzen aus autotrophem und heterotrophem Material von Thermoproteus tenax und die Referenzsubstanz aus Halobacterium halobium stimmten in folgenden Eigenschaften überein:

- R_F -Werte der DC (Abb. 11)
- Retentionszeiten im GC nach Derivatisierung mit Perfluorpropionsäureanhydrid. Die Gaschromatogramme zeigten jeweils nur einen Peak.
- Massenspektren

Eine Aussage über die Konfiguration des sekundären C-Atoms des Glycerins ist nicht möglich, da die optischen Drehwerte aus Materialmangel nicht bestimmt werden konnten.

1.3.2 DC-Bandenpaket 3: Diglycerin-tetraether

Bei dem Bandenpaket 3 handelt es sich nach den im folgenden beschriebenen spektroskopischen und chemischen Untersuchungen um ein Gemisch ähnlich gebauter Tetraethermoleküle. Bande 3 aus autotroph gezogenen Bakterien enthält sieben verschiedene Komponenten. Der einfachste Vertreter ist das 2,3,2',3'-Tetra-O-dibiphytanyl-di-sn-glycerin, das zwei acyclische Kohlenwasserstoffketten enthält (Abb. 1C). Dieser Tetraether wird als 0+0 Typ (keine Cyclopentanringe in beiden C_{40} -Kohlenwasserstoffen) bezeichnet. Die übrigen Homologen besitzen eine steigende Zahl von Cyclopentanringen, sind also vom Typ 0+1, 0+2, 1+1, 1+2 und 2+2 (Abb. 17C-G). Die 7. Komponente, die nur in geringen Mengen vorkommt, ist wahrscheinlich der Tetraether vom 2+3 Typ (Abb. 17H).

Heterotroph gezogene Bakterien enthalten als Hauptkomponente den Tetraether vom 2+2 Typ, während die analogen Verbindungen mit wenig Funfringen kaum vorkommen.

1.3.2.1 Analyse des gesamten Bandenpakets

Das Bandenpaket 3 mit einem R_F -Wert von 0,2-0,4 im System Chloroform/Ethylacetat 85:15 wurde als Ganzes mittels präparativer DC isoliert. Es besteht bei autotrophem Material aus den fünf intensiven Banden 3/1 bis 3/5 und einer schwachen sechsten Bande 3/6, während in heterotrophem Material die Substanzen 3/1, 3/2 und 3/3 abwesend sind und die Bande 3/5 dominiert (Abb. 11).

Die folgenden Untersuchungen wurden mit dem gesamten Bandenpaket 3 durchgeführt.

a) Spektroskopische Eigenschaften

Die IR-Spektren der Banden 3 aus autotrophem bzw. heterotrophem Material stimmen mit den Spektren der Tetraether in der Literatur überein (58).

Das ^1H -NMR-Spektrum von Bande 3 aus autotrophem Material entspricht ebenfalls den Literaturangaben (58) und zeigt Signale bei 0,9 ppm, hervorgerufen durch Methylprotonen aus Alkylketten und Signale im Bereich von 1,0 bis 1,6 ppm, die von Methylen- bzw. Methinprotonen der Alkylketten stammen. Kleinere Peaks im Bereich 3,6 ppm sind den Protonen an den C-Atomen in α -Stellung zu Sauerstoffatomen zuzuordnen. Die Integration der Signale ergibt 42 Methylprotonen, 106 Methylen- bzw. Methinprotonen und 18 Protonen an Sauerstoffatomen benachbarten C-Atomen und stützt die Vorstellung, daß das Bandenpaket 3 im Durchschnitt aus der Tetraetherstruktur vom 1+1 Typ mit zwei Cyclopentanringen und 14 Methylgruppen besteht. Das Fehlen von Signalen im Bereich von 4,5 bis 6,0 ppm bestätigt die Abwesenheit von Doppelbindungen in den Alkylketten.

Im FAB-Massenspektrum von Bande 3 aus autotrophem Material beobachtet man $M^+ + 1$ Ionen von m/z 1294 bis m/z 1305 mit einer Intensitätsverteilung (Abb. 12), die mit den berech-

neten Intensitäten der Molekulionen und deren Isotopenpeaks eines aquimolaren Gemisches aus fünf Glycerin-tetraethern der Summenformeln $C_{86}H_{164-172}O_6$ übereinstimmen. In heterotrophem Material fand man $M^+ + 1$ Signale im Bereich von m/z 1294 bis m/z 1297. Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß der Tetraether vom 2+2 Typ mit der Summenformel $C_{86}H_{164}O_6$ dominiert.

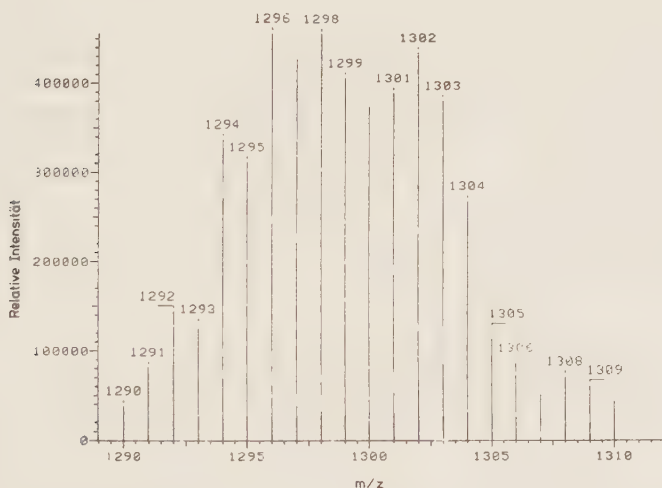


Abb. 12. Ausschnitt der $M^+ + 1$ Ionen aus dem FAB-Massenspektrum von Bandenpaket 3 aus *Thermoproteus tenax*, autotroph gezogen.

b) Bausteinanalyse

Die spektroskopischen Messungen wurden durch eine qualitative und quantitative Bausteinanalyse von Bande 3 ergänzt. Nach Spaltung mit Jodwasserstoffsäure und Reduktion mit Zink/Essigsäure fand man mit GC/MS und quantitativer GC in autotrophem Material die bereits beschriebenen Kohlenwasserstoffe $C_{40}H_{82}$ (36%), $C_{40}H_{80}$ (31%), $C_{40}H_{78}$ (33%) und in

geringer Menge $C_{40}H_{76}$, in heterotrophem Material $C_{40}H_{82}$ (3%), $C_{40}H_{80}$ (11%), $C_{40}H_{78}$ (86%) und in Spuren $C_{40}H_{76}$. Dies bestätigt das Ergebnis der FAB-Massenspektroskopie, daß Bande 3 aus $PL1_{aut}$ von allen Tetraethertypen etwa gleich viel und Bande 3 aus $PL1_{het}$ den Tetraethertyp 2+2 als Hauptkomponente enthalten. Der Gesamtgehalt an C_{40} -Kohlenwasserstoffen wurde mittels quantitativer GC bestimmt. In autotrophem Material fand man 1,8 Mol, in heterotrophem Material 1,7 Mol C_{40} -Kohlenwasserstoffe pro Mol Tetraether. Der Glyceringehalt von Bande 3 wurde in der wässrigen Phase der Spaltung mit Bortrichlorid enzymatisch bestimmt. Nach Korrektur der Glycerinwerte mit dem für die Standardsubstanz D, L-Batylalkohol (Octadecylglycerin) ermittelten Wiederfindungsfaktor von 76%, fand man in autotrophem Material 1,8 Mol, in heterotrophem Material 1,9 Mol Glycerin pro Mol Tetraether.

c) Verknüpfung der C_{40} -Kohlenwasserstoffe mit Glycerin

Die oben beschriebenen Untersuchungen mit dem Bandenpaket 3 zeigen, daß ein Gemisch ähnlich gebauter Tetraether, die jeweils aus zwei C_{40} -Kohlenwasserstoffen und zwei Glycerinmolekülen aufgebaut sind, vorliegt. Im folgenden wird dargelegt, wie diese Bausteine miteinander verknüpft sind.

Nach unvollständiger Methylierung von Bande 3 waren im Reaktionsgemisch, gemäß DC mit Chloroform/Essigester 85:15, geringe Mengen Ausgangsprodukt (R_F 0,3), geringe Mengen eines Bandenpakets mit R_F 0,7 und große Mengen einer Bande mit R_F 0,9 enthalten (Abb. 20). Es ist anzunehmen, daß es sich bei den beiden neu entstandenen Banden um die Monomethyl- bzw. Dimethyl-derivate der Tetraether handelt, was auf zwei freie OH-Gruppen in der Tetraetherstruktur hinweist.

Ein Aliquot von Bandenpaket 3 wurde nach Spaltung mit Jodwasserstoffsäure mit Zink/Deuteroessigsäure reduziert. Die Moleküllionen der C_{40} -Kohlenwasserstoffe waren jeweils um zwei Masseneinheiten schwerer als die Moleküllionen der Kohlenwasserstoffe aus der Reduktion mit Zink/Essigsäure (53). Die C_{40} -Kohlenwasserstoffe haben demnach zwei Bindungsstellen. Die Fragmentionen waren um eine Masseneinheit erhöht. Nur das aus der Mitte des Moleküls stammende Ion m/z 291 im Kohlenwasserstoff $C_{40}H_{78}$ wird im deuterierten Kohlenwasserstoff $C_{40}H_{76}D_2$ nicht schwerer (s. Kapitel III.1.2.3). Daraus wird gefolgert, daß sich die Verknüpfungsstellen der Kohlenwasserstoffe jeweils an den beiden Kettenenden befinden.

Die spezifischen Drehwerte der Tetraethergemische aus autotrophem ($[\alpha]_D = +9,9^\circ$) bzw. aus heterotrophem Material ($[\alpha]_D = +11,0^\circ$) stimmen mit den Literaturangaben überein (59).

Der Drehwert eines Moleküls setzt sich aus den Beiträgen der einzelnen Asymmetriezentren im Molekül zusammen (60). Bei den Diether- bzw. Tetraethermolekülen leisten die Asymmetriezentren an den tertiären C-Atomen der Kohlenwasserstoffketten, verglichen mit den sekundären C-Atomen der Glycerinmoleküle, einen vernachlässigbar kleinen Beitrag (59, 61). Da der spezifische Drehwert von 2,3,2',3'-Tetra-O-dibiphytanyl-sn-glycerin $+8,5^\circ$ beträgt (59), müssen in den vorliegenden Tetraethergemischen beide sekundären C-Atome der Glycerinmoleküle ebenfalls sn-2,3-Konfiguration besitzen. Von den vielfältigen Verknüpfungsmöglichkeiten zwischen den beiden C_{40} -Kohlenwasserstoffen und den zwei Glycerinmolekülen eines Tetraethers bleiben, wenn man die Variationen, bedingt durch die Cyclopentanringe in den C_{40} -Kohlenwasserstoffen, außer Acht läßt, noch zwei Strukturen (Abb. 13).

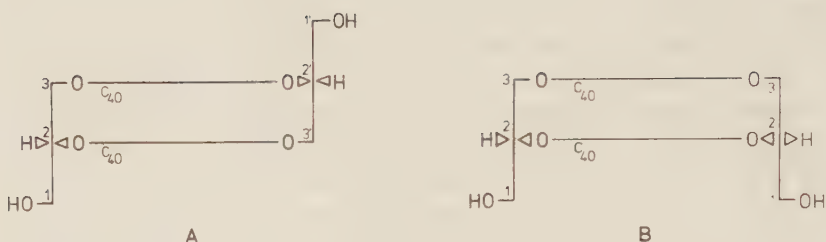


Abb. 13. Strukturschemata von Diglycerin-tetraethern mit (A) "antiparalleler" bzw. (B) "paralleler" Anordnung der Glycerinmoleküle.

Bei der Struktur in Abb. 13A, die in *Sulfolobus solfataricus* von De Rosa et al. gefunden wurde (59), sind jeweils ein primäres und ein sekundäres C-Atom der beiden Glycerinmoleküle miteinander verknüpft, d.h. die Glycerinmoleküle sind "antiparallel" angeordnet. Bei der Struktur in Abb. 13B sind jeweils die primären bzw. sekundären C-Atome der Glycerinmoleküle über Alkylketten miteinander verbunden, die Glycerinmoleküle sind "parallel" angeordnet. Eine Unterscheidung zwischen diesen Strukturen ist prinzipiell mit Hilfe der ^{13}C -NMR-Spektroskopie möglich.

Über die Konfiguration der Asymmetriezentren der Alkylketten ist nach dem oben Gesagten keine Aussage möglich. Man kann jedoch annehmen, daß in Analogie zu den Diethermolekülen in Halobakterien die tertiären C-Atome in R-Konfiguration vorliegen (61).

Das ^{13}C -NMR-Spektrum von Bandenpaket 3 aus autotrophem Material zeigt Peaks mit chemischen Verschiebungen von 78,5; 71,2; 70,1; 68,6; 63,1; 44,8; 39,1; 38,2; 37,4; 36,6; 36,0; 35,7; 34,3; 33,4; 33,1; 32,8; 31,2; 29,8; 25,9; 24,5; 19,9; 17,7 ppm. Diese Angaben stimmen mit den Literaturdaten für

Tetraether aus acyclischen, mono- und bicyclischen C_{40} -Kohlenwasserstoffen überein (62). Die ^{13}C -NMR-Daten bestätigen, daß die C_{40} -Kohlenwasserstoffe über ihre endständigen C-1- bzw. C-1'-Atome mit den Glycerinmolekülen verknüpft sind (Nummerierung der C-Atome s. Abb. 14).

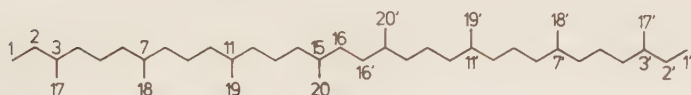


Abb. 14. Nummerierung der C-Atome des Kohlenwasserstoffs Biphytan $C_{40}H_{82}$.

De Rosa et al. fanden, daß die chemischen Verschiebungen der endständigen C-Atome der C_{40} -Kohlenwasserstoffe mit 0 bis 2 Cyclopentanringen 68,6 ppm bzw. 70,1 ppm betragen, wenn sie an ein sekundäres bzw. primäres C-Atom eines Glycerinmoleküls gebunden sind (59). Beide Werte erhöhen sich um jeweils 1,1 ppm, wenn die Alkylkette am C-3-Atom, wie bei dem tricyclischen C_{40} -Kohlenwasserstoff in *Sulfolobus solfataricus*, einen Fünfring trägt (59). Der Tetraether vom 3+3 Typ in *Sulfolobus* zeigt in tiefem Feld Signale mit den chemischen Verschiebungen 78,5, 71,2, 68,6 und 63,3 ppm. Daraus konnte die punktsymmetrische Struktur dieses Moleküls abgeleitet werden, in der die beiden Alkylketten und die zwei Glycerinmoleküle jeweils "antiparallel" stehen (Abb. 15).

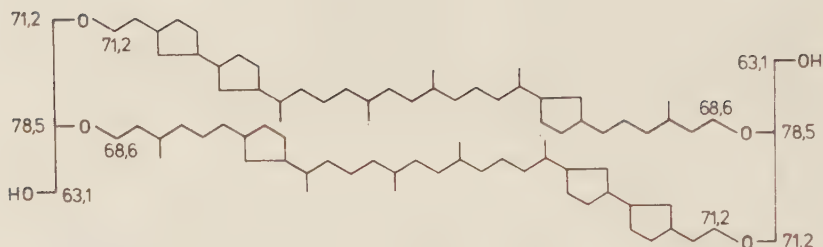


Abb. 15. Struktur des Diglycerin-tetraethers vom 3+3 Typ aus *Sulfolobus solfataricus*.

Die Zahlen geben die chemischen Verschiebungen in ppm der den Sauerstoffatomen benachbarten C-Atomen bei der ^{13}C -NMR-Spektroskopie an.

Die Cyclopentanringe in den C_{40} -Kohlenwasserstoffen von *Thermoproteus tenax* befinden sich an den C-7- bzw. C-7'-Atomen und sind so weit von den Kettenenden entfernt, daß sie die chemischen Verschiebungen der endständigen C-Atome nicht beeinflussen (59). Aus diesem Grund kann man hier mit Hilfe der ^{13}C -NMR-Spektroskopie nicht zwischen den Strukturen in Abb. 13 unterscheiden. Außerdem ist keine Aussage über die Orientierung der monocyclischen Kohlenwasserstoffe in den Tetraethern möglich. So kann sich z.B. beim Tetraether vom 0+1 Typ (Abb. 17C) der Funfring des monocyclischen, asymmetrischen Kohlenwasserstoffs entweder näher am sekundären C-2-Atom eines Glycerins, oder näher am primären C-3-Atom befinden.

Mit einer Röntgenstrukturanalyse konnte die exakte Struktur dieser Tetraethermoleküle bestimmt werden.

1.3.2.2 Analyse der Einzelkomponenten

Die Untersuchungen des Bandenpakets 3 sicherten weitgehend die Struktur der Diglycerin-tetraether, doch fehlten Angaben über die Verteilung der acyclischen, mono- und bicyclischen Kohlenwasserstoffe. Diese sollte die Analyse der Einzelkomponenten liefern.

Mittels präparativer HPLC über eine Kieselgelsäule wurden aus dem Bandenpaket 3 aus autotroph gezogenen Zellen, nach Derivatisierung mit p-Nitrobenzoylchlorid, fünf etwa gleich große Peaks und ein kleiner sechster Peak mit der längsten Retentionszeit isoliert (Abb. 16).

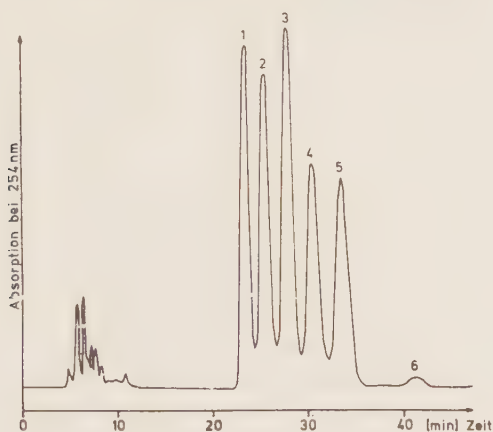


Abb. 16. HPLC-Diagramm von Bandenpaket 3 (Thermoproteus tenax, autotroph gezogen) nach Derivatisierung mit p-Nitrobenzoylchlorid.

Das Peakmuster bei der HPLC entsprach dem Bandenmuster bei der DC. Die p-Nitrobenzoylreste der isolierten Tetraether wurden mit Kalilauge abhydrolysiert. Die freien Tetraether analysierte man mittels DC, um die HPLC-Peaks der p-Nitrobenzoylester den DC-Banden der freien Tetraether zuzuordnen.

Der Peak mit der kürzesten Retentionszeit (Peak 1) entspricht der Bande mit dem größten R_F -Wert (Bande 3/1), usw. Von jeder der sechs Komponenten wurde massenspektrometrisch das Molekulargewicht bestimmt: nach Spaltung mit Jodwasserstoffsäure und anschließender Reduktion mit Zink/Essigsäure wurden die freigesetzten C_{40} -Kohlenwasserstoffe charakterisiert und ihr Mengenverhältnis bestimmt. Tabelle 4 faßt die Ergebnisse der Analyse der Einzelkomponenten zusammen.

Tabelle 4: Charakterisierung der Einzelkomponenten von Bandenpaket 3.

DC-Bande	3/1	3/2	3/3	3/4	3/5	3/6
HPLC-Peak	1	2	3	4	5	6
Relative Menge*	1,0	1,1	1,4	1,0	1,0	0,1
Molekulionen m/z	1301	1299	1297	1295	1293	1291
% $C_{40}H_{82}$	100	52	26	-	-	11
$C_{40}H_{80}$	-	48	50	50	-	11
$C_{40}H_{78}$	-	-	24	50	100	42
$C_{40}H_{76}$	-	-	-	-	-	35
Tetraethertyp	0+0	0+1	0+2/ 1+1	1+2	2+2	(2+3)
Anzahl der Cyclopentanringe	0	1	2	3	4	5

* ermittelt durch Integration der Peak-Flächen in der HPLC

Bande 3/1 besitzt ein Molekulargewicht von 1301 und enthält nur den Kohlenwasserstoff $C_{40}H_{82}$. Dies zeigt, daß ein Tetraether mit zwei acyclischen Kohlenwasserstoffen, also ein 0+0 Typ vorliegt. Bande 3/2 (M_r 1299) enthält die Kohlenwasserstoffe $C_{40}H_{82}$ und $C_{40}H_{80}$ im Verhältnis 1:1 und entspricht somit dem Tetraether vom 0+1 Typ; Entsprechendes gilt für die Banden 3/4 (M_r 1295) und 3/5 (M_r 1293). Die Bande 3/3 (M_r 1297) scheint nicht in dieses Schema zu passen, denn sie enthält die drei Kohlenwasserstoffe $C_{40}H_{82}$, $C_{40}H_{80}$ und $C_{40}H_{78}$ im Verhältnis 1:2:1.

Die Bande 3/3 wird als ein 1:1 Gemisch der Tetraethertypen 0+2 und 1+1 interpretiert. Diese Deutung wird verständlich, wenn man die räumliche Struktur dieser Moleküle betrachtet. Die einzelnen Bis-p-nitrobenzoyl-tetraether waren chromatographisch vermutlich deshalb trennbar, weil ein Funfring die C_{40} -Alkylkette um etwa 5% verkürzt. Betrachtet man die Tetraether als Makrozyklen, so ist der Tetraether vom 0+0 Typ der größte Makrozyklus, während die Typen 0+1, 0+2, 1+1, 1+2 und 2+2 einen zunehmend kleineren Umfang besitzen. Die Moleküle, vom 0+2 und 1+1 Typ haben die gleiche Zahl an Cyclopentanringen im Zyklus, sind also gleich groß und deshalb in dem angewendeten HPLC-System nicht trennbar. Es spielt für die chromatographische Trennbarkeit offenbar keine Rolle, ob sich die Cyclopentanringe in einer Kette befinden, oder ob sie in beiden Alkylketten verteilt sind. Die Interpretation von Bande 3/6 (M_r 1291) als 2+3 Typ ist aufgrund der geringen vorliegenden Substanzmengen unsicher.

Die Strukturen der in *Thermoproteus tenax* gefundenen hydrophoben Grundkörper sind in Abb. 17 dargestellt.

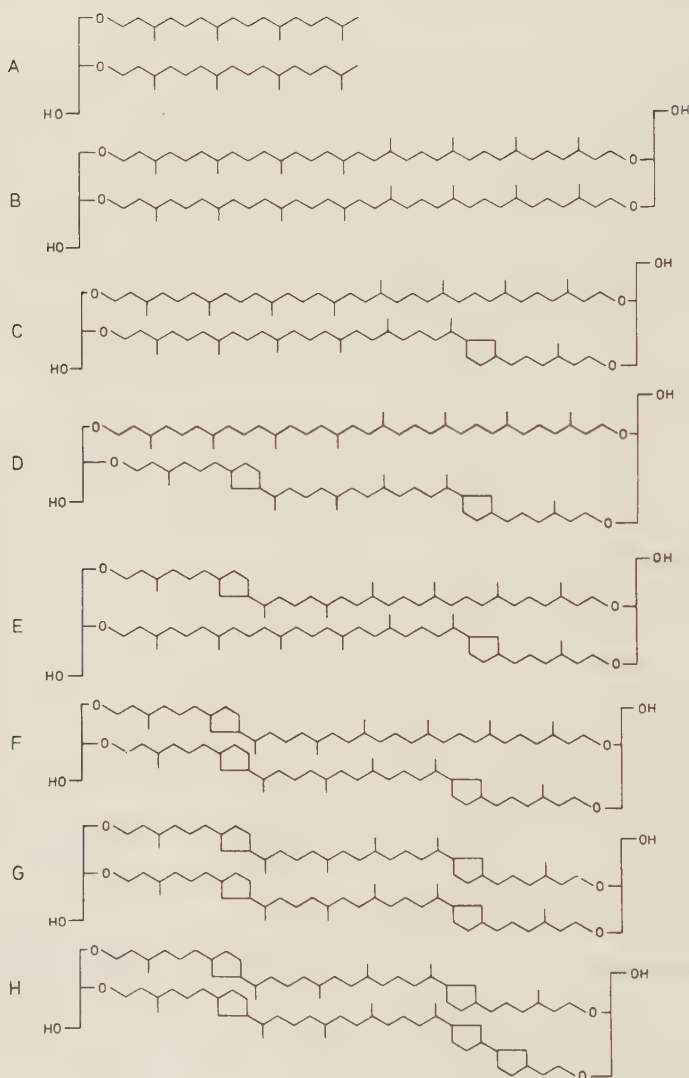


Abb. 17. Strukturen der hydrophoben Grundkörper in *Thermoproteus tenax*.

A: Glycerin-diether; B: Diglycerin-tetraether vom Typ 0+0;
 C: Tetraether vom 0+1 Typ; D: 0+2 Typ; E: 1+1 Typ; F: 1+2
 Typ; G: 2+2 Typ; H: 2+3 Typ.

1.4 Analyse der Glykolipide

Die Lipide von *Thermoproteus tenax* bestehen aus unpolaren Neutrallipiden (5%) und polaren Glyko- (20%) und Phospholipiden (75%), (s. Kapitel III.1.1). Als hydrophobe Grundkörper wurden unpolare Diglycerin-tetraether (95%) und Glycerin-diether ermittelt. Die hydrophoben Grundkörper müssen demnach mit hydrophilen Komponenten verknüpft sein. Im folgenden werden die Strukturen einiger Glykolipide beschrieben.

Die GL-Fraktion enthält als einzige hydrophile Komponente Glucose, die als TMS-Derivat im Salzsäurehydrolysat nachgewiesen wurde (s. Kapitel III.1.2.4). Uronsäuren wären bei dieser Silylierungsanalyse ebenso erfaßt worden wie Aminosucker bei der GC/MIS-Analyse der Alditolacetate (s. Kapitel III.1.4.1). Da die Glykolipid-Fraktion unter den Bedingungen der alkalischen Hydrolyse (s. Kapitel III.1.5.1) gemäß DC unverändert bleibt, ist die Abwesenheit von Estern mit Carbonsäuren, Phosphor- oder Schwefelsäure gesichert. Die GL-Fraktion wurde mit dem nicht-ionischen Lösungsmittelgemisch Chloroform/Methanol 7:3 von der DEAE-Cellulose-Säule eluiert; d.h. die Anwesenheit ionischer Gruppen kann ausgeschlossen werden.

Die Bausteinanalyse zeigt also, daß die Glykolipide von *Thermoproteus tenax* aus Tetraethern (evtl. Diether) und Glucose aufgebaut sind.

Präparative Dünnschichtchromatographie

Die GL-Fraktion besteht, gemäß DC (Abb. 5), aus sechs verschiedenen Komponenten. Aufgrund der Erfahrung anderer (63) und der oben beschriebenen Analyse der hydrophoben Grundkörper konnte man erwarten, daß es sich bei den einzelnen DC-Banden um Mischungen sehr ähnlicher Verbindungen aus einem konstanten hydrophilen Teil und

variablen Tetraetherresten handelt. Deshalb war es notwendig, die einzelnen Glykolipid-Banden durch präparative DC zu isolieren und zu charakterisieren. Aus autotrophem bzw. heterotrophem Material isolierte man jeweils die Banden GLA bis GLF (Abb. 5). Tabelle 5 zeigt, daß das unpolarste Glykolipid A (R_F 0,80) mengenmäßig dominiert.

Die in größerer Menge (mehr als 10 mg) isolierten Lipide GLA, GLC, GLD aus autotrophem, bzw. GLA und GLD aus heterotrophem Material wurden weiter untersucht.

Tabelle 5: R_F -Werte und Gewichtsprozent (bezogen auf den Gesamtlipidgehalt) der Glyko- und Phospholipide in *Thermoproteus tenax*

Glykolipide	GLA	GLB	GLC	GLD	GLE	GLF
R_F -Werte	0,8	0,75	0,75	0,5	0,3	0,2
%	10	1	2	6	0,5	0,5

Phospholipide	PLA	PLB	PLC	PLD	PLE	PLF
R_F -Werte	0,35	0,3	0,2	0,15	0,1	0,05
%	3	1	50	6	14	1

1.4.1 Glykolipid A: Monoglucosyl-tetraether

Glykolipid A ist das am einfachsten gebaute Glykolipid aus *Thermoproteus tenax*; es handelt sich um β -Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 1)-diglycerin-tetraether (Abb. 22).

Die Bausteinanalyse der GL-Fraktion hatte ergeben, daß die Glykolipide ausschließlich aus Tetraethern oder Diethern und

Glucose aufgebaut sind. Hydrolyse von GLA mit 1N methanolischer Salzsäure und DC-Analyse der organischen Phase sollte zeigen, mit welchen hydrophoben Grundkörpern Glucose verknüpft ist. GLA aus autotrophem Material enthält Diglycerin-tetraether hauptsächlich vom 0+0 und 0+1 Typ; GLA_{het} Tetraether überwiegend vom 2+2 Typ (Abb. 18).

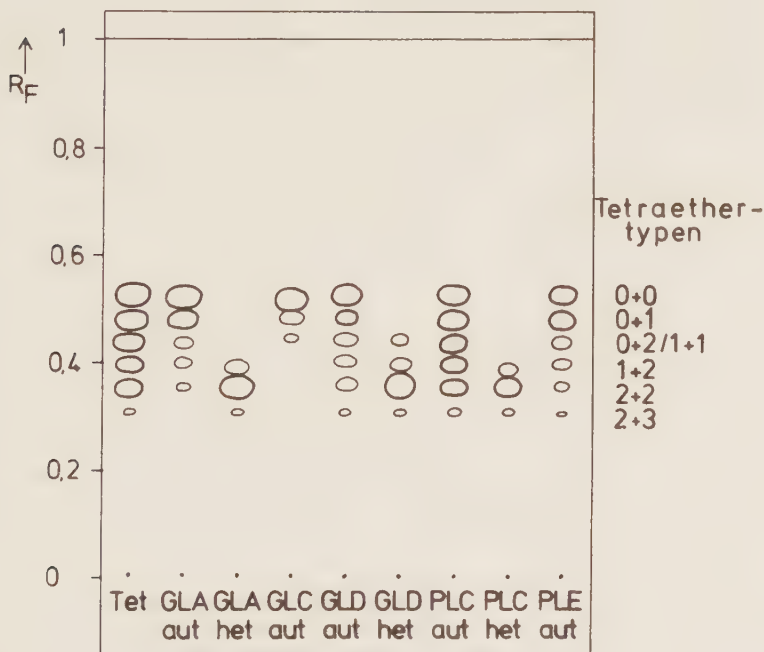


Abb. 18. Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel von den organischen Phasen der MeOH/HCl-Hydrolysen von Glyko- und Phospholipiden aus *Thermoproteus tenax*.

Laufmittel: HCCl_3 /Ethylacetat 85:15; Detektion: H_2SO_4 /MeOH 1:1; GLA: Glykolipid A; GLC: Glykolipid C; GLD: Glykolipid D; PLC: Phospholipid C; PLE: Phospholipid E; aut: autotroph; het: heterotroph.

Ergänzend zur Analyse der Zucker in der GL-Fraktion als Trimethylsilylderivate (s. Kapitel III.1.2.4), untersuchte man die Alditolacetate, die aus GLA durch Hydrolyse, Reduktion mit Natriumborhydrid und Acetylierung hergestellt wurden. Die GC/MIS-Analyse bestätigt das Vorhandensein von Glucose als einzige Zuckerkomponente. Die Integration des Fragmentions m/z 289 ergab für GLA_{aut} einen Glucosegehalt von 5,2 Gewichtsprozent; GLA_{het} enthielt 8,0% Glucose, während Tetraether-monoglucosid 12,3% Glucose erfordert. Diese Daten deuten auf einen Glucoserest im Molekül. Das 1H -NMR-Spektrum von GLA, mit der Integration der Signale der Protonen, die sich an C-Atomen in α -Stellung zu Sauerstoffatomen befinden (3,6-5,0 ppm), und der Integration der Protonensignale der Alkylketten (0,8-2,0 ppm), zeigt ebenfalls, daß GLA einen Glucoserest enthält.

Da GLA bereits mit 1N methanolischer Salzsäure hydrolysiert wurde, muß die Glucose in einer saurelabilen Vollacetalbindung mit einer der beiden Glycerinreste des Tetraethers verknüpft sein. Das Signal bei 103,6 ppm im ^{13}C -NMR-Spektrum von GLA ist charakteristisch für eine β -glucosidische Verknüpfung (64). Die Struktur von GLA, als ein β -Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 1)-diglycerin-tetraether, gilt für autotroph und heterotroph gezogene Zellen.

1.4.2 Glykolipid C (autotroph): Diglucosyl-tetraether

Bei Glykolipid C handelt es sich um Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 1)-diglycerin-tetraether (Abb. 22).

Die DC-Analyse der hydrophoben Grundkörper zeigt, daß GLC_{aut} überwiegend Diglycerin-tetraether vom 0+0 und 0+1 Typ enthält (Abb. 18). Die quantitative Zuckerbestimmung von GLC mit der GC/MIS-Methode ergab einen Glucosegehalt von 14%. Folglich enthält GLC zwei Glucosereste; Tetraether-diglucosid fordert 22% Glucose.

Dieses Ergebnis wurde durch die Partialhydrolyse von GLC mit

0,07N wässriger Salzsäure bestätigt. Die organische Phase des Hydrolysats besteht aus drei Komponenten, deren R_F -Werte mit denen von GLC, GLA und Bande 3 übereinstimmen (Abb. 19). Durch sukzessive Abspaltung von Glucose lassen sich demnach aus GLC zwei Abbauprodukte, nämlich Monoglucosyl-tetraether und freier Tetraether erzeugen.



Abb. 19. Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel von den organischen Phasen der Partialhydrolysen von Glykolipiden aus *Thermoproteus tenax*, autotroph.

Laufmittel: $\text{HCCl}_3/\text{MeOH}$ 85:15; Detektion: $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ 1:1; Tet: Diglycerin-tetraether; GLC: Glykolipid C; GLD: Glykolipid D; part: partiell hydrolysiert.

Die Verknüpfung der Bausteine klarte man durch Methylierungsanalyse nach Hakomori (43). Nach Methylierung und Hydrolyse von GLC wurde ein Aliquot des Produktgemisches mittels DC untersucht (Abb. 20). Im Bereich der hydrophoben Komponenten mit $R_F > 0,3$ ist nur eine Bande zu erkennen. Diese hat den gleichen R_F -Wert wie der Monomethyltetraether, der als Standard durch unvollständige Methylierung des freien Tetraethers erzeugt worden war. Dies bedeutet, daß die beiden Zucker an eine Seite des Tetraethers gebunden sind.

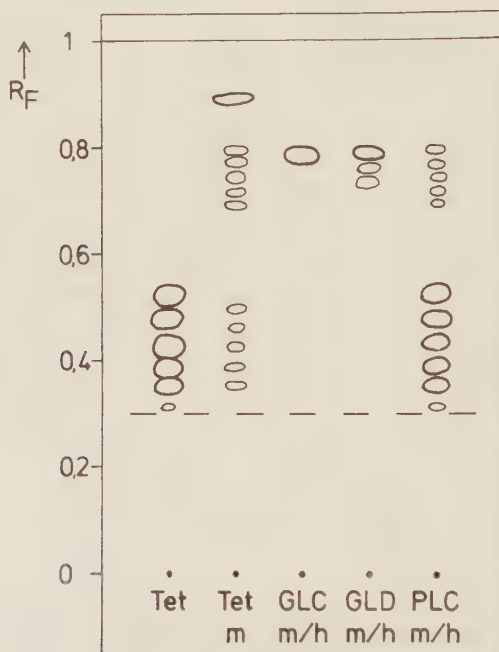


Abb. 20. Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel von methylierten und hydrolysierten Glyko- und Phospholipiden aus *Thermoproteus tenax*, autotroph.

Laufmittel: HCCl_3 /Ethylacetat 85:15; Detektion: H_2SO_4 /MeOH 1:1; Tet: Diglycerin-tetraether; GLC: Glykolipid C; GLD: Glykolipid D; PLC: Phospholipid C; m: methyliert; m/h: methyliert und hydrolysiert.

Nach Methylierung und Hydrolyse von GLC wurden die freigesetzten Zuckerkomponenten mit Natriumborhydrid reduziert und acetyliert. Die partiell methylierten Alditolacetate identifizierte man durch GC/MS als 1,5-Diacetyl-2,3,4,6-tetramethylhexit und als 1,5,6-Triacetyl-2,3,4-trimethylhexit (65). Daraus folgt, daß die Glucosemoleküle als Glucopyranosyl-(1→6)-glucopyranosid an eine Hydroxylgruppe des Tetraethers gebunden sind. Wahrscheinlich sind die Glucosemoleküle in GLC, analog GLA und PLC (s. Kapitel III.1.5.2), β -glykosidisch verknüpft.

1.4.3 Analyse von Glykolipid D: Trigluco-syl-tetraether

Bei Glykolipid D handelt es sich um Glucopyranosyl-(1→6)-glucopyranosyl-(1→6)-glucopyranosyl-(1→1)-diglycerin-tetraether (Abb. 22).

Die DC-Analyse der hydrophoben Grundkörper (Abb. 18) ergibt, daß GLD_{aut} Tetraether vom 0+0, 0+1, 0+2, 1+1, 1+2, 2+2 Typ jeweils in gleicher Menge enthält, GLD_{het} hingegen überwiegend den Tetraether vom 2+2 Typ.

Der Glucosegehalt von GLD betrug nach der GC/MIS-Analyse der Alditolacetate 17%, während ein Trigluco-syl-tetraether 30% Glucose freisetzt. Das Verhältnis der Alkyl-Protonen (0,9-2,0 ppm) und der Protonen an C-Atomen in Nachbarstellung zu Sauerstoffen (3,5-5,1 ppm) im 1H -NMR-Spektrum zeigt, daß GLD drei Glucosereste enthält. Die Partialhydrolyse zu den Abbauprodukten GLC (Digluco-syl-tetraether), GLA (Monogluco-syl-tetraether) und Bande 3 (Tetraether) bestätigt drei Glucosereste in GLD (Abb. 19). Die Verknüpfung der Bausteine von GLD wurde wie bei GLC bestimmt. Das DC von methyliertem und hydrolysiertem Lipid zeigt nur Monomethyltetraether (Abb. 20), d.h. alle drei Glucosereste befinden sich auf einer Seite des Tetraethers. Das Ergebnis der GC/MS-Analyse der methylierten Alditolacetate war mit dem von GLC identisch. Man fand 1,5-Di-

acetyl-2,3,4,6-tetramethylhexit und 1,5,6-Triacetyl-2,3,4-trimethylhexit; die Glucosen sind demzufolge (1 $\rightarrow$ 6)-verknüpft. Im ^1H -NMR-Spektrum von GLD in Deuteropyridin waren in tiefem Feld 2 Dupletts bei 5,02 und 5,08 ppm mit den Integrationen von jeweils einem Proton und Kopplungskonstanten von 7 Hz, vorhanden. Die beiden Dupletts zeigen, daß GLD zwei β -glucosidische Bindungen besitzt (66). Die Konfiguration des dritten anomeren C-Atoms von GLD konnte aus dem ^1H -NMR-Spektrum nicht ermittelt werden.

Die in geringer Menge in *Thermoproteus tenax* enthaltenen Glykolipide E und F sollten aufgrund ihrer R_F -Werte mindestens vier Glucosereste enthalten. Da in der GL-Fraktion auch der Glycerin-diether gefunden wurde (s. Abb. 11 und Kapitel III.1.3.1), konnten die Glykolipide B, E und/oder F Diether-glucoside sein.

1.5 Analyse der Phospholipide

Die Phospholipide, die mit ca. 75% den Hauptanteil der Lipide von *Thermoproteus tenax* darstellen, waren in zwei Fraktionen (PL1 und PL2) von der DEAE-Cellulose-Säule eluiert worden. Alle mit Schwefelsäure verkohlbaren Komponenten der PL1- und PL2-Fraktion ließen sich mit dem Molybdanblau-Reagens detektieren, enthielten also Phosphatgruppen. Die Bausteinanalyse der PL-Fraktionen in Kapitel III.1.2 hatte gezeigt, daß sie als hydrophobe Grundkörper überwiegend Diglycerin-tetraether, in geringer Menge Glycerin-diether und als hydrophile Bestandteile Glucose und myo-Inosit enthalten. Im folgenden wird gezeigt, wie die Bausteine miteinander verknüpft sind und welche Beziehungen zu den Glykolipiden bestehen.

Präparative Dünnschichtchromatographie

Die PL1-Fraktion (etwa 60% der Gesamtlipide) enthält die weniger polaren Phospholipide, und zwar hauptsächlich die Komponenten PLA, PLB, PLC, während die PL2-Fraktion (ca. 15% der Gesamtlipide) vor allem die Komponenten PLD, PLE und PLF enthält (Abb. 5). Die Komponenten PLA bis PLF wurden durch präparative DC isoliert. Dabei stellte sich heraus, daß PLC mit einem Anteil von etwa 50% das dominierende Lipid aus *Thermoproteus tenax* ist (Tabelle 5).

1.5.1 Alkalische Hydrolyse der einzelnen Phospholipide

Alle isolierten Phospholipide unterwarf man 3 h einer alkalischen Hydrolyse mit 1N Natronlauge; die organischen Phasen wurden mittels DC untersucht. Die Phospholipide wurden zu Komponenten mit den gleichen R_F -Werten, wie die in den vorhergehenden Kapiteln beschriebenen Glykolipide bzw.

hydrophoben Grundkörper abgebaut. Die Phospholipide sind demnach Phosphoglykolipide, die durch Abspaltung von Phosphatgruppen unter alkalischen Bedingungen in die entsprechenden Glykolipide bzw. hydrophoben Grundkörper überführt werden können (Abb. 21).

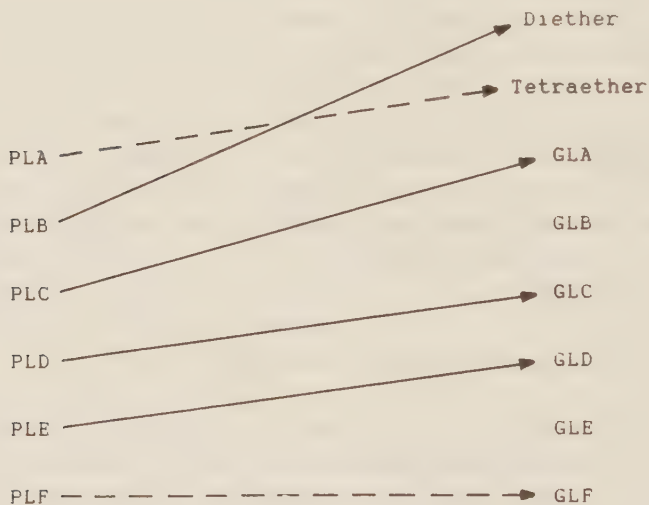


Abb. 21. Schema des alkalischen Abbaus der Phospholipide zu Glykolipiden, Tetraethern oder zum Diether.

Die gestrichelten Linien bedeuten, daß die Zuordnung aufgrund der geringen Materialmengen nicht sicher ist.

Das Hauptphospholipid PLC wird zum Hauptglykolipid GLA abgebaut, PLD zu GLC und PLE zu GLD. Die Hydrolyse der Komponenten PLC bis PLE aus heterotrophem Material führt zu den gleichen Abbauprodukten wie bei den Phospholipiden aus autotroph gezogenen Bakterien.

Die in größerer Menge isolierten Phospholipide C und E wurden weiter untersucht.

1.5.2 Phospholipid C: Monoglucosyl-tetraether-myo-inositolphosphat

Bei Phospholipid C handelt es sich um β -Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 1)-diglycerin-tetraether-myo-inositolphosphat; an einer freien Hydroxylgruppe des Tetraethers ist Glucose, an der anderen Hydroxylgruppe myo-Inositolphosphat gebunden (Abb. 22). PLC lag als Ammoniumsalz vor, denn es wurde mit einem Ammoniakpuffer von der DEAE-Cellulose-Säule eluiert. Die DC-Analyse der hydrophoben Grundkörper zeigt, daß PLC_{aut} die Tetraethertypen 0+0, 0+1, 1+1, 1+2 und 2+2 in gleichen Mengen enthält, PLC_{het} jedoch überwiegend den 2+2 Typ (Abb. 18). Die GC/MIS-Analyse der Alditolacetate ergab, daß PLC_{aut} und PLC_{het} einen Glucoserest enthalten. Dieses Ergebnis und der Abbau von PLC zu GLA (Monoglucosyl-tetraether) unter alkalischen Bedingungen beweisen, daß ein Glucoserest vorhanden ist. Nach Umsetzung von PLC mit 6N Salzsäure wurde in der wässrigen Phase des Hydrolysats myo-Inositol als einzige Komponente nachgewiesen; Glucose wird unter diesen Bedingungen zerstört. Die Integration des ¹H-NMR-Spektrums von PLC ergibt einen Glucose- und einen Inositrest pro Molekül. Nach der quantitativen Phosphatbestimmung enthält PLC_{aut} 0.9 Mol, und PLC_{het} 0.6 Mol Phosphat pro Mol Phospholipid.

Nach den oben beschriebenen Ergebnissen ist PLC_{aut} bzw. PLC_{het} aus jeweils einem Molekül Diglycerin-tetraether, Glucose, myo-Inositol und Phosphat aufgebaut. Aus den Ergebnissen der sauren Hydrolyse und des alkalischen Abbaus von PLC folgt, daß Glucose in einer Acetalbindung direkt an den Tetraether gebunden ist und Inositol esterartig an das Phosphat.

Die Frage, ob Inositolphosphat mit der Glucose oder mit dem zweiten Glycerin des Tetraethers verknüpft ist, wurde durch Methylierungsanalyse und ¹³C-NMR-Spektroskopie beantwortet. Bei der GC/MS-Analyse der methylierten Alditolacetate von PLC fand man als einzige Komponente 1,5-Diacetyl-2,3,4,6-

tetramethylhexit, das einer endständigen Glucose entspricht (65). Demnach muß sich die Phosphatgruppe auf der anderen Seite des Tetraethers befinden. Das Dunnschichtchromatogramm von methyliertem und hydrolysiertem PLC (Abb. 20) zeigt tatsächlich freien Teraether, doch in geringeren Mengen auch Monomethyltetraether, was sich damit erklären läßt, daß die Phosphatgruppe unter den stark alkalischen Methylierungsbedingungen teilweise abgespalten und durch eine Methylgruppe ersetzt wird.

Im ^{13}C -NMR-Spektrum von PLC war, wie bei GLA, ein Signal bei 61,6 ppm zu erkennen, das dem C-6-Atom der Glucose entspricht (64). Der ebenfalls bei GLA auftretende Peak bei 63,1 ppm, der dem C-1-Atom des freien Glycerins zuzuordnen ist (59), fehlt jedoch. Demnach sind die C-1-Atome beider Glycerinreste des Tetraethers substituiert. Das ^{13}C -NMR-Spektrum bestätigt das Ergebnis der Methylierungsanalyse und zeigt weiter, daß die Glucose β -ständig mit dem Tetraether verknüpft ist (Signal bei 103,6 ppm, (64)). Die Frage, an welches C-Atom des Inosits die Phosphatgruppe gebunden ist, blieb ungeklärt.

1.5.3 Phospholipid E (autotroph)

Die für Phospholipid E_{aut} vorliegenden Ergebnisse führten zu folgendem Modell: PLE ist ein Phosphoglykolipid bestehend aus GLD (Triglucosyl-tetraether) und Inositphosphat. Der Tetraetherrest besteht vor allem aus den Typen 0+0 bzw. 0+1 (Abb. 22). PLE sollte als Kaliumsalz vorliegen, da es mit einem Kaliumhydrogenphthalat-Puffer von der Ionenaustauschersäule eluiert wurde.

Die Zuckeranalyse der Alditolacetate aus PLE mit der GC/MIS-Methode zeigte, daß auch PLE als einzige Zuckerkomponente Glucose enthält und zwar in einer Menge von 11 Gewichtsprozent anstelle der von oben beschriebenen Modell geforderten 26%. PLE war durch alkalische Hydrolyse in GLD

überführbar und mußte somit mindestens drei Glucosereste enthalten. Die quantitative Phosphatbestimmung ergab 0,7 Mol Phosphat pro Mol PLE; das bedeutet, PLE enthält wie PLC eine Phosphatgruppe.

Das Ergebnis der Integration der Signale der Alkylprotonen (0,9-2,0 ppm) und der Signale der Protonen an C-Atomen in α -Stellung zu Sauerstoffatomen (3,5-5,2 ppm) im ^1H -NMR-Spektrum von PLE, stimmt mit dem Modell eines Triglucosyl-tetraether-inositphosphats überein. Im tiefen Feld des ^1H -NMR-Spektrums waren, wie bei GLD, zwei Dupletts bei 5,02 und 5,08 ppm mit den Kopplungskonstanten von 7 Hz vorhanden. Die Dupletts, die jeweils einem Proton entsprachen, zeigen, daß PLE, ebenso wie GLD, zwei β -glucosidische Bindungen enthält (66).

Neben den oben charakterisierten Phosphoglykolipiden kommen in *Thermoproteus tenax* in geringer Menge Phospholipide vor. Bei PLB dürfte es sich, nach dem Ergebnis des alkalischen Abbaus (Abb. 21), um einen Glycerin-diether handeln, dessen freie Hydroxylgruppe durch einen Phosphatrest substituiert ist. PLA konnte analog dazu eine Diglycerin-tetraether-phosphat-Verbindung sein.

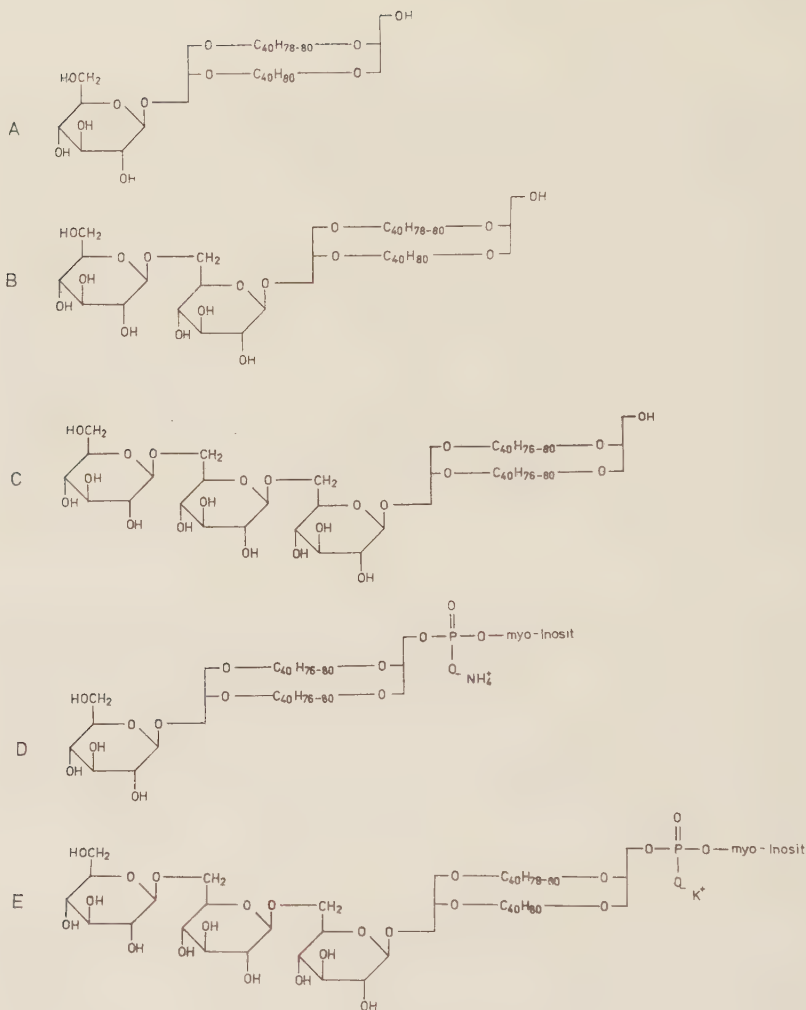


Abb. 22. Chemische Strukturen polarer Lipide aus *Thermoproteus tenax*.

A: Monoglucosyl-tetraether (GLA); B: Diglucosyl-tetraether (GLC); C: Triglucosyl-tetraether (GLD); D: Monoglucosyl-tetraether-myo-inositolphosphat (PLC); E: Triglucosyl-tetraether-inositolphosphat. Die angegebenen Tetraether-typen gelten für die aus autotrophem Material isolierten Lipide.

1.8 Diskussion der Ergebnisse der Analyse der Glycerolipide

Thermoproteus tenax besitzt wie die anderen Archaeobakterien Etherlipide; es konnten keine aus dem Organismus stammenden Fettsäuren nachgewiesen werden. So bleibt die Frage weiterhin offen, ob Archaeobakterien Fettsäuren bzw. Fettsäure-esterlipide besitzen.

Bei den hydrophoben Grundkörper von *Thermoproteus tenax* handelt es sich, wie bei den *Sulfolobus*-Spezies (3) und *Thermoplasma acidophilum* (3), überwiegend um Tetraether (95%) und wenig Diether (5%). Die Tetraether sind ausschließlich Diglycerin-tetraether; Glycerinnonit-tetraether, die in großer Menge in *Sulfolobus*-Spezies (3) gefunden wurden, kommen nicht vor. *Thermoproteus tenax* ist nach *Methanosarcina barkeri* (21) das zweite anaerobe Archaeobakterium, in dem Cyclopentanringe in den Alkylketten der Tetraether gefunden wurden. Offensichtlich ist Sauerstoff für die noch ungeklärte Biosynthese der Funfringe nicht erforderlich. Die in *Thermoproteus tenax* gefundenen hydrophoben Grundkörper, der Diether und die Tetraether vom 0+0, 0+1, 1+1, 1+2, 2+2 und 2+3 Typ kommen auch in *Sulfolobus solfataricus* vor; dieser Organismus enthält zusätzlich die Tetraethertypen 3+3, 3+4 und 4+4 (15, 67). Der Tetraether vom 0+2 Typ wurde noch nicht beschrieben. De Rosa et al. fanden Tetraether vom n+n Typ und n+(n+1) Typ, jedoch keine Moleküle vom n+(n+2) Typ, in denen sich die Zahl der Cyclopentanringe der beiden Alkylketten um zwei unterscheidet (15, 67).

Die Strukturen der Grundkörper von *Thermoproteus tenax* sind, mit Ausnahme des Tetraethers vom 2+3 Typ, weitgehend gesichert, doch

- sind die Konfigurationen der asymmetrischen C-Atome in den Alkylketten der Tetraether, sowie die Konfigurationen aller Asymmetriezentren des Diethers unbekannt.

- ist nicht geklärt, ob die Alkylketten der Tetraether jeweils die primären bzw. die sekundären C-Atome der Glycerinbausteine verbinden oder primäre mit sekundären C-Atomen.
- ist die Orientierung der asymmetrischen, monocyclischen Kohlenwasserstoffe in den Tetraethern vom 0+1, 1+1 und 1+2 Typ noch offen.

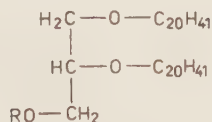
Die Lipide von *Thermoproteus tenax* bestehen aus 5% Neutrallipiden, 20% Glykolipiden und 75% Phospholipiden, eine Verteilung, die für Archaeobakterien typisch ist (3, 15). In der NL-Fraktion kommen, wie in anderen Archaeobakterien (3), in geringer Menge freie Tetraether vor, die wahrscheinlich Biosynthesevorstufen der Glyko- und Phospholipide sind.

Neben den Strukturen der hydrophoben Grundkörper wurden in *Thermoproteus tenax* die Strukturen einiger neuer polarer Lipide aufgeklärt. Die in Abb. 22 dargestellten Strukturen sind jedoch nicht in allen Fällen genau geklärt. So sind die Konfigurationen der anomeren C-Atome bei GLC, GLD und PLE nicht bekannt. Außerdem sind die Verknüpfungen der Bausteine von PLE nicht bewiesen.

Die Glykolipide von *Thermoproteus tenax* sind in der Hauptsache Tetraether, die an einer Hydroxylgruppe mit 1 bis 3 Glucoseresiden verknüpft sind. Bei den Phospholipiden handelt es sich überwiegend um Phosphoglykolipide, die formal aus den Glykolipiden durch Substitution der zweiten freien Hydroxylgruppe der Tetraether mit Inositolphosphat hervorgehen. Die Glykolipide stellen vermutlich nicht nur biosynthetische Vorstufen der Phosphoglykolipide dar, sondern dürften, da sie in relativ großer Menge (20%) vorkommen, als nicht-ionische Lipide spezielle Funktionen in der Zellmembran erfüllen.

Bisher wurden aus anderen Archaeobakterien nur wenige polare Lipide charakterisiert. Einen Überblick der bekannten Strukturen geben die Tabellen 6 und 7.

Tabelle 6: Polare Diether-lipide aus Archaeobakterien.



Diether

%

R

Halobacterium	sn-3-(1-phospho)-glycerin-P	65
cutirubrum	sn-3-glycerin-P	4
(3,15,61,68)	sn-3-(1-sulfo)-glycerin-P	4
	β -galp-3-sulfat-(1 $\rightarrow$ 6)- α -manp-	25
	(1 $\rightarrow$ 2)- α -glcp	
	β -galp(1 $\rightarrow$ 6)- α -manp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -glcp	Sp
	β -galp-3-sulfat-(1 $\rightarrow$ 6)- α -manp-	Sp
	(3 $\leftarrow$ 1 α -galf)-(1 $\rightarrow$ 2)- α -glcp	
	β -galp-(1 $\rightarrow$ 6)-manp-(3 $\leftarrow$ 1 α -galf)-	Sp
	(1 $\rightarrow$ 2)- α -glcp	
Methano-	α -glcp-(1 $\rightarrow$ 2)- β -galf	17
spirillum	β -galf-(1 $\rightarrow$ 6)- β -galf	2
hungatei (69)	sn-1-glycerin-P	5

Sp: Spurenmengen an Substanz; Die Zahlen in Klammern bei den Organismen bedeuten Literaturangaben.

galp: galactopyranosyl; galf: galactofuranosyl;

glcp: glucopyranosyl; manp: mannopyranosyl.

Tabelle 7: Polare Tetraether-lipide aus Archaeobakterien.

$ \begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{C}_{40}\text{H}_{72}-80-\text{O}-\text{CH} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{HC}-\text{O}-\text{C}_{40}\text{H}_{72}-80-\text{O}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{R}^1-\text{CH}_2 \end{array} $			
	Tetraether		%
	R ¹	R ²	
Methano-	H	α -glcp-(1 $\rightarrow$ 2)- β -galf	0,5
spirillum	sn-1-glycerin-P	α -glcp-(1 $\rightarrow$ 2)- β -galf	50
hungatei (68)	H	β -galf-(1 $\rightarrow$ 6)- β -galf	0,2
	sn-1-glycerin-P	β -galf-(1 $\rightarrow$ 6)- β -galf	4
Thermoplasma	sn-3-glycerin-P	monosaccharid	
acidophilum	H	[α -manp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -manp-(1 $\rightarrow$ 4)- α -manp-(1 $\rightarrow$ 3)] ₈ - α -glcp	
(3)			
Sulfolobus	DGT: H	β -glcp- β -galp	4,5
solfataricus	inosit-P	H	6
(15)	inosit-P	β -glcp- β -galp	*
	GNT: H	β -glcp	10,5
	H	β -glcp-sulfat	8
	inosit-P	β -glcp	*
Thermoproteus	H	β -glcp (GLA)	10
tenax	H	glcp-(1 $\rightarrow$ 6)-glcp (GLC)	2
	H	glcp-(1 $\rightarrow$ 6)-glcp-(1 $\rightarrow$ 6)-glcp (GLD)	6
	myo-inosit-P	β -glcp (PLC)	50
	inosit-P, triglucosid (PLE)		14

* beide Phospholipide ergeben zusammen 48%

DGT: Diglycerin-tetraether; GNT: Glycerinnonit-tetraether;

R² ist bei GNT mit dem C-6 des Nonits verbunden (Abb. 1D).

Die Glykolipide aus anderen Archaeobakterien sind komplizierter gebaut als die Lipide aus *Thermoproteus tenax* und enthalten neben Glucose häufig Galactose oder Mannose. Sulfatierte Glykolipide wie bei *Halobacterium cutirubrum* (61) oder *Sulfolobus solfataricus* (15) wurden in *Thermoproteus tenax* nicht gefunden. Bei allen archaeobakteriellen Glykolipiden, die sich von Tetraethern ableiten, sind die Kohlenhydrate nur mit einer Hydroxylgruppe der Tetraether verknüpft (Tabelle 7). Mit Ausnahme der Halobakterien enthalten die bisher analysierten Archaeobakterien, einschließlich *Thermoproteus tenax*, als Hauptkomponenten Phospholipide mit Zuckerresten, und zwar Tetraetherderivate, die an einer der beiden freien Hydroxylgruppen durch Kohlenhydrate und an der zweiten Hydroxylgruppe durch Glycerin- oder Inositphosphat substituiert sind (Tabellen 6 und 7). Die polaren archaeobakteriellen Lipide, die sich von Tetraethern ableiten, sind unsymmetrische Moleküle. Die Orientierung dieser Lipide in der "monolayer" Membran ist von biologischer Bedeutung. Es gibt experimentelle Hinweise, daß sich die Zuckerreste der Glyko- und Phosphoglykolipide von *Sulfolobus solfataricus* auf der Außenseite der Zellmembran befinden (15). Analog dazu sind die Glykolipide von Halobakterien (70) und einigen Eubakterien auf der Außenseite der "bilayer" Membranen angeordnet (71). Es wäre interessant, auch bei *Thermoproteus tenax* die Orientierung der polaren Lipide in der Zellmembran zu untersuchen.

Die Lipide von heterotroph gezogenen Zellen sind denen aus autotrophen Zellen sehr ähnlich. Die hydrophoben Grundkörper sind in beiden Fällen prinzipiell gleich gebaut, doch enthalten heterotroph gewachsene Zellen fast ausschließlich Tetraether vom 2+2 Typ, während bei autotrophen Zellen die Tetraethertypen 0+0, 0+1, 0+2, 1+1, 1+2, 2+2 in gleicher Menge vorkommen. Die Glyko- und Phospholipide aus heterotroph gezogenen Zellen entsprechen denen aus autotroph gezüchteten Zellen.

Die Lipidanalyse von *Sulfolobus solfataricus* liefert ein anderes Ergebnis: die Lipide aus autotroph und heterotroph gezogenen Zellen weisen den gleichen Cyclisierungsgrad auf, während Unterschiede im Bau der polaren Lipide bestehen (72). Analysendaten von *Sulfolobus solfataricus* und *Thermoplasma acidophilum* zeigen, daß der Cyclisierungsgrad der Tetraetherlipide mit steigender Wachstumstemperatur zunimmt (73). Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, daß diese Archaeobakterien, als Reaktion auf höhere Umwelttemperaturen, ihre Membranfluidität durch Cyclisierung der Tetraetherlipide verringern (3). Neuere Ergebnisse, das Vorkommen von Cyclopentanringen in dem mesophilen Archaeobakterium *Methanosarcina barkeri* (21), sowie das Fehlen von Fünfringen in dem extrem thermophilen Archaeobakterium *Pyrodictium occultum* (3), stützen diese Hypothese nicht. Auch das Ergebnis der Lipidanalyse bei *Thermoproteus tenax*, wonach bei gleicher Temperatur gezogene, autotrophe und heterotrophe Zellen sehr große Unterschiede im Gehalt der Cyclopentanringe aufweisen, bestätigt die Hypothese nicht. Die Cyclisierung in den Tetraetherlipiden scheint somit keine Form der Temperaturanpassung bei Archaeobakterien zu sein.

2. Glycerolipide aus *Thermoproteus species H₃*

Thermoproteus species H₃ ist ein von Zillig entdecktes, noch nicht beschriebenes, stabchenförmiges Archaeobakterium der Ordnung Thermoproteales. *Thermoproteus species H₃* wächst unter den gleichen Bedingungen wie *Thermoproteus tenax*, unterscheidet sich von diesem jedoch in einigen biochemischen Eigenschaften, z.B. im Muster seiner Ribosomen-Proteine (74). Deshalb wird *Thermoproteus species H₃* als eigenständige Art neben *Thermoproteus tenax* angesehen (74). Eine kurze Charakterisierung der Lipide von *Thermoproteus species H₃* sollte weitere Informationen zur Taxonomie liefern.

Man untersuchte die Lipide in autotroph gezogenem *Thermoproteus species H₃* in ähnlicher Weise wie die Lipide von *Thermoproteus tenax*. Die Lipide wurden nur einmal mit Chloroform/Methanol 2:1 extrahiert, weshalb die Lipid-ausbeute mit 3% vom Lyophilisat geringer als bei *Thermoproteus tenax* (6%) war. Die Gewichtsverhältnisse der Lipidfraktionen (5% NL-, 30% GL- und 65% PL-Fraktion) waren denen aus *Thermoproteus tenax* ähnlich (s. Kapitel III.1.1).

a) Dunnschichtchromatographische Analyse

Die GL- und PL-Fraktionen wurden mittels DC untersucht und mit den entsprechenden Fraktionen von *Thermoproteus tenax* verglichen. Das Bandenmuster der GL-Fraktionen war bei beiden Organismen ähnlich. *Thermoproteus species H₃* enthält jedoch im Gegensatz zu *Thermoproteus tenax* kein Glykolipid C und zusätzlich zwei sehr polare Glykolipide. Das Bandenmuster der PL-Fraktionen der beiden Archaeobakterien war gleich. Ein DC-Vergleich der organischen Phasen der methanolischen Salzsaure Hydrolyseansätze der PL1-Fraktionen zeigte, daß auch *Thermoproteus species H₃* hauptsächlich Diglycerin-tetraether und wenig Glycerin-diether enthält.

b) Gaschromatographische Analyse

Zur Ergänzung der Ergebnisse der DC-Analyse wurden die NL-Fraktion und die polaren Lipide den bei *Thermoproteus tenax* beschriebenen chemischen Abbaureaktionen (Abb. 6) unterworfen und die entstandenen Bausteine mit GC/MS untersucht.

In der organischen Phase der methanolischen Salzsäure Hydrolysate fand man die gleichen Verbindungen wie bei *Thermoproteus tenax*, also Dioctylphthalat, geringe Mengen Fettsäuren und Kohlenwasserstoffe.

In der organischen Phase der Spaltung mit Bortrichlorid wurde sowohl in der NL-Fraktion, als auch bei den polaren Lipiden mittels GC/MS, Phytanylchlorid nachgewiesen und so das Vorkommen von Glycerin-diether bestätigt.

Die organische Phase der Reduktion mit Zink/Essigsäure mit den polaren Lipiden enthielt 30% Kohlenwasserstoff $C_{40}H_{82}$, 30% $C_{40}H_{80}$ und 40% $C_{40}H_{78}$. In der NL-Fraktion konnten keine C_{40} -Kohlenwasserstoffe nachgewiesen werden. *Thermoproteus species H₃* enthält also weniger acyclisches und mehr bicyclisches Biphytan als die ebenfalls autotroph gezogenen Zellen von *Thermoproteus tenax* mit 46% $C_{40}H_{82}$, 25% $C_{40}H_{80}$ und 29% $C_{40}H_{78}$ (s. Kapitel III.1.2.3).

In der wässrigen Phase der BCl_3 -Spaltung wurde als einziges Polyol Glycerin gefunden. Dieses Ergebnis, die Analyse der C_{40} -Kohlenwasserstoffe und die DC-Analyse, zeigen, daß *Thermoproteus species H₃* wie *Thermoproteus tenax* als hydrophobe Grundkörper überwiegend Diglycerin-tetraether und keine Glycerinonit-tetraether enthält.

In der wässrigen Phase des methanolischen Salzsäure Hydrolysats der polaren Lipide wurden nach Silylierung mittels GC/MS TMS-Glucose und geringe Mengen TMS-Inosit und TMS-Glycerin gefunden.

Die Ergebnisse der GC-Analysen bei *Thermoproteus species H₃* decken sich mit denen von *Thermoproteus tenax*. Ausnahmen sind Unterschiede im Mengenverhältnis der C_{40} -Kohlenwasser-

stoffe und die Anwesenheit von Glycerin in der wässrigen Phase des methanolischen Salzsäure Hydrolysats. Hier deutet sich ein Unterschied im Bau der Phospholipide an.

Die oben beschriebenen Untersuchungen zeigen, daß *Thermoproteus species H₃* Lipide des archaebakteriellen Typs besitzt, die den Lipiden von *Thermoproteus tenax* sehr ähnlich sind. Dies rechtfertigt die Zuordnung von *Thermoproteus species H₃* zur Gattung *Thermoproteus*.

3. Glycerolipide aus *Sulfolobus species B6/2*

Sulfolobus species B6/2 ist ein noch nicht beschriebenes, schwefelabhängiges Archaeobakterium der Ordnung Sulfolobales und wurde in Beppu, Japan, isoliert. Die Lipide von autotroph gezogenem *Sulfolobus B6/2* wurden wie bei *Thermoproteus tenax* extrahiert und in eine NL-Fraktion und in polare Lipide aufgetrennt. Die Lipide von *Sulfolobus B6/2* zeigen im DC ein qualitativ anderes Bandenmuster als die Lipide von *Thermoproteus tenax*. Die hydrophoben Grundkörper der polaren Lipide von *Sulfolobus B6/2* wurden in der organischen Phase des methanolischen Salzsäure Hydrolysats mittels DC untersucht (Abb. 23). Das DC aus *Sulfolobus B6/2* zeigte eine schwache Zone mit dem gleichen R_F -Wert wie der Glycerin-diether und in größerer Menge das Bandenpaket der Diglycerin-tetraether, die überwiegend vom 1+2 und 2+2 Typ sind, und eine dritte, intensive Bande mit einem noch kleineren R_F -Wert. Die dritte Bande besitzt den gleichen R_F -Wert wie Glycerinnonit-tetraether (67), die zu Vergleichszwecken aus *Sulfolobus solfataricus* isoliert wurden.

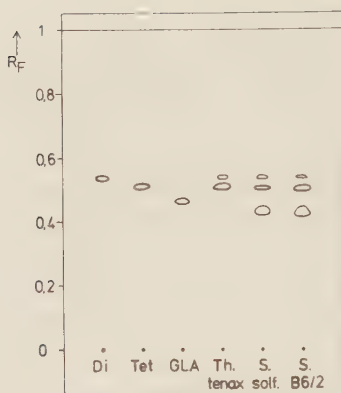


Abb. 23. Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel von den organischen Phasen der MeOH/HCl-Hydrolysen der polaren Lipid-Fraktionen aus verschiedenen Archaeobakterien. Laufmittel: $\text{HCCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1; Detektion: $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ 1:1; Di: Glycerin-diether; Tet: Diglycerin-tetraether; GLA: Glykolipid A; Th.tenax: Hydrolysat aus *Thermoproteus tenax*; S.solf.: Hydrolysat aus *Sulfolobus solfataricus*; S.B6/2: Hydrolysat aus *Sulfolobus* B6/2.

Das Vorkommen von Glycerinnonit-tetraether wurde gestützt durch GC-Analyse aus der wässrigen Phase der Spaltung mit Bortrichlorid der polaren Lipide nach Einengen und Trimethylsilylieren. In *Sulfolobus* B6/2 und in *Sulfolobus solfataricus* fand man neben einem Peak mit der Retentionszeit von TMS-Glycerin jeweils einen Doppelpeak mit der etwa 1,4 fachen Retentionszeit von TMS-Sorbit, bei dem es sich um TMS-Nonit handeln mußte.

Die Analyse der hydrophoben Grundkörper zeigt, daß *Sulfolobus* B6/2 Etherlipide des archaeobakteriellen Typs besitzt, die für *Sulfolobus*-Spezies charakteristisch sind (67) und bestätigt die Klassifizierung von *Sulfolobus* B6/2 zur Gattung *Sulfolobus*.

4. Isoprenoide Chinone aus schwefelabhängigen Archaeobakterien

Isoprenoide Chinone, vor allem Ubichinone und Menachinone, sind in Eubakterien weit verbreitet. Sie kommen nur in geringen Mengen vor und spielen bei Elektronentransportvorgängen in der Cytoplasmamembran eine Rolle. Aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens werden diese Chinone u.a. als Markersubstanzen für taxonomische Zwecke benutzt.

In Archaeobakterien fand man bisher homologe Menachinone (23), ein Methylmenachinon (24), und Caldariella-chinon (25), ein Thiophenchinon mit einer Polyisopentylseitenkette (Abb. 2). Die schwefelhaltigen Archaeobakterien lassen aufgrund ihrer unterschiedlichen Lebensweisen (autotrophes/heterotrophes und aerobes/anaerobes Wachstum) eine Vielfalt an isoprenoiden Chinonen erwarten.

4.1 Isoprenoide Chinone aus *Thermoproteus tenax*

Isoprenoide Chinone in *Thermoproteus tenax* wären bei der Lipidfraktionierung wegen ihrer hydrophoben Eigenschaften in die Neutrallipid-Fraktion gelangt.

Die NL-Fraktion von *Thermoproteus tenax* wurde mittels DC mit Laufmittelsystemen unterschiedlicher Polarität auf die Anwesenheit farbiger Substanzen untersucht. Chinone zeigen UV-Absorption bei 254 nm und sind in größerer Konzentration farbig, meist gelblich. Mit dem Laufmittelsystem Hexan/Diethylether 85:15, mit dem Ubichinone (R_F ca. 0,3; s. Abb. 2) und Menachinone (R_F ca. 0,7; s. Abb. 2) getrennt werden, fand man eine gelbe Bande mit einem R_F -Wert von 0,7. Außerdem waren sieben weitere farblose, bei 254 nm absorbierende Banden zu erkennen.

Diese acht Komponenten wurden mittels präparativer DC auf HPTLC-Kieselgelplatten isoliert: ihre UV- und Massenspektren

zeigten, daß nur die oben beschriebene gelbe Bande (R_F 0,7) und eine Bande mit R_F 0,75 Chinonmaterial enthalten. Das Gewicht aller isolierten Chinone entspricht etwa 0,1% bezogen auf das Lyophilisat.

4.1.1 Analyse der DC-Bande mit R_F 0,7: Menachinone

Die gelbe Bande mit R_F 0,7 besteht aus einem Gemisch bisher noch nicht beschriebener, homologer Chinone vom Menachinontyp mit perhydrierten Alkylseitenketten. Außerdem sind in geringer Menge Menachinone vom Phyllochinontyp (eine Doppelbindung in der ersten C_5 -Einheit) vorhanden (Abb. 24). Das UV-Spektrum der gelben Bande, gemessen in n-Hexan, zeigte Absorptionsmaxima bei 241, 247, 261, 270 und 324 nm und ist mit den Literaturdaten (75) von Menachinonen identisch. Dies deutete darauf hin, daß ein 2,3-disubstituiertes 1,4-Naphthochinonsystem vorlag. Das Massenspektrum der gelben Bande zeigte die Anwesenheit von sechs Chinonen. Im oberen Massenbereich beobachtete man Molekülionen bei m/z 592, 522 und 452; die Differenz von 70 Masseneinheiten deutete auf die Anwesenheit von drei homologen Chinonen mit unterschiedlicher Länge der Polyisopentylseitenkette. Molekülionen bei m/z 590, 520 und 450 wiesen auf drei Chinone analoger Struktur hin, die eine Doppelbindung in der Seitenkette enthalten. Nach einer quantitativen Schätzung mittels der GC/MIS-Methode, bei der die sechs Molekülionen simultan registriert wurden, dominieren die beiden Komponenten MK-6(12H) und MK-4(8H) mit jeweils etwa 40%, während der Anteil der übrigen Menachinone jeweils kleiner als 5% ist.

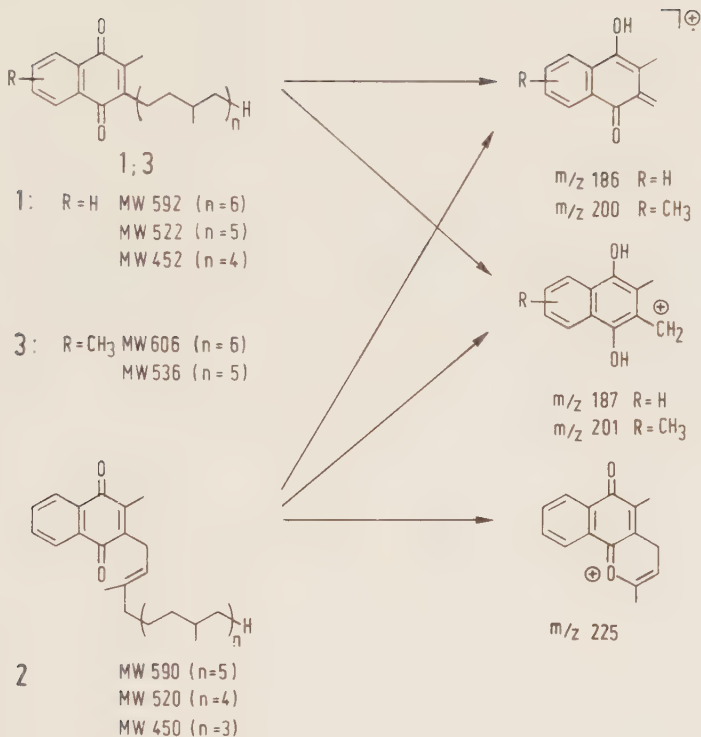


Abb. 24. Strukturen und Fragmentierungsschema der isoprenoiden Chinone aus *Thermoproteus tenax*.

1: Menachinone: MK-6(12H), M_r 592; MK-5(10H), M_r 522; MK-4(8H), M_r 452;

2: Menachinone vom Phyllochinontyp: MK-6(10H), M_r 590; MK-5(8H), M_r 520; MK-4(6H), M_r 450;

3: Methylmenachinone: Methyl-MK-6(12H), M_r 606; Methyl-MK-5-(10H), M_r 536.

Die gelbe Bande wurde mittels präparativer DC auf RP-18 HPTLC-Platten in vier chinonhaltige Zonen aufgetrennt. Die Hauptkomponente (R_F 0,3) ist das Menachinon MK-6(12H). Die exakte Massenbestimmung ergibt eine Elementarzusammensetzung von $C_{41}H_{68}O_2$ (gefunden 592,5241; berechnet 592,5202). Intensive Fragmentationen bei m/z 186, 187 und die Abwesenheit eines Signals bei m/z 225 (Abb. 25) zeigen, ebenso wie die 1H -NMR-Daten, die Anwesenheit einer Seitenkette aus sechs Isopentyl-Einheiten. Eine Deutung der prominenten Ionen des Massenspektrums gibt Abbildung 24; die Resonanzsignale des 1H -NMR-Spektrums (Abb. 27) werden in Tabelle 8 interpretiert.

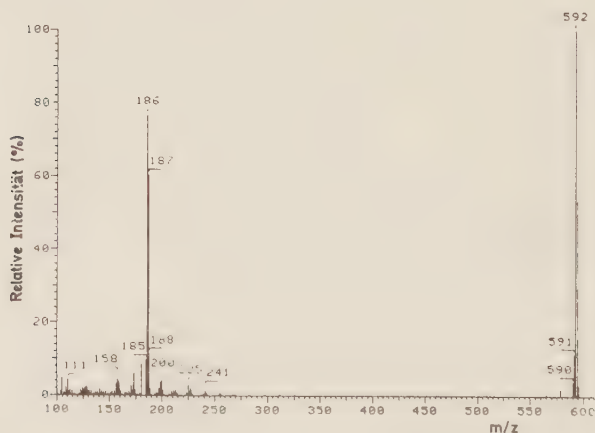


Abb. 25. Massenspektrum (70 eV) von Menachinon MK-6(12H), M_r 592.

Das Chinon mit einem R_F -Wert von 0,35 ist das Menachinon MK-6(10H) mit der Elementarzusammensetzung $C_{41}H_{66}O_2$ (gefunden 590,5069; berechnet 590,5046). Das Massenspektrum weist zusätzlich zu den Fragmentationen m/z 186, 187 das Ion m/z 225 auf (Abb. 26) und beweist so, daß die C_5 -Einheit mit einer Doppelbindung direkt an das Naphthochinonsystem gebunden ist. Dieses Chinon gehört demnach zum Phyllochinontyp. Die oben erwähnte quantitative Abschätzung der Chinone durch GC/MIS-Analyse wird bestätigt durch die Integration der Signale c) und d) des 1H -NMR-Spektrums der Menachinone (Abb. 27). Das Multiplett bei 2,62 ppm stammt von den beiden Protonen am C-1-Atom der Seitenkette im vollkommen hydrierten Menachinon MK-6(12H), während das Duplett bei 3,37 ppm zu dem Chinon vom Phyllochinontyp MK-6(10H) gehört (Tabelle 8).

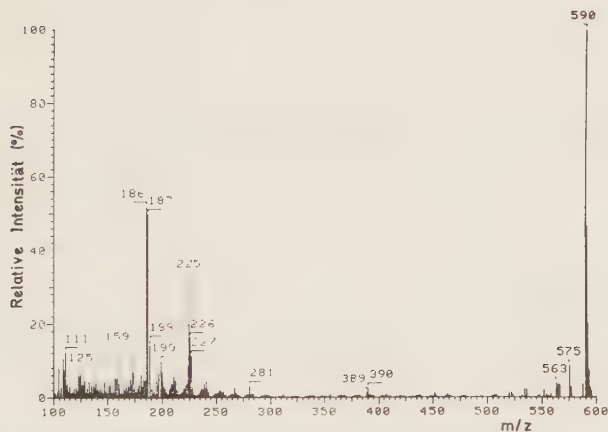


Abb. 26. Massenspektrum (70 eV) von Menachinon MK-6(10), M_r 590.

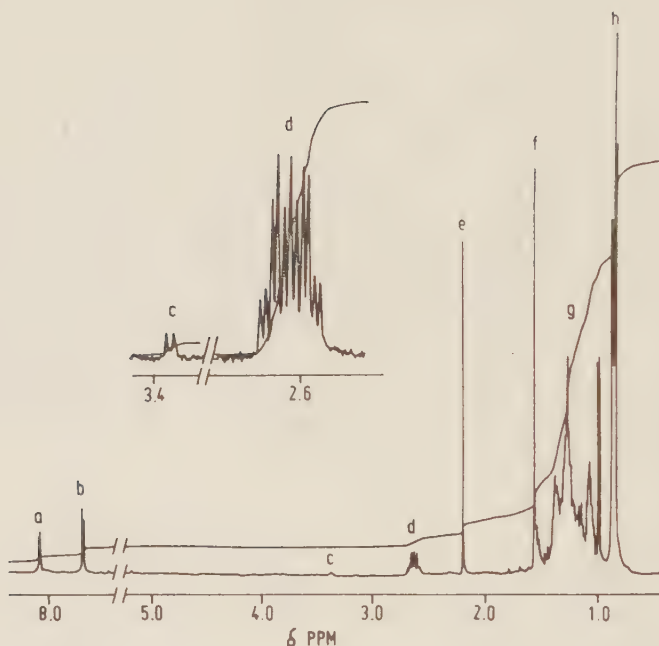


Abb.27. ^1H -NMR Spektrum (500 MHz) eines Gemischs der Mena-
chinone MK-6(12H) und MK-6(10H) in Deuteriochloroform.

Die Zone mit R_F 0,4 war ein Gemisch aus MK-5(10H) und wenig MK-5(8H); die Bande mit R_F 0,55 enthielt Menachinon MK-4(8H) und wenig MK-4(6H). In diesen beiden Fällen konnten die Chinonpaare, die sich in der Doppelbindung der ersten Isopreneinheit der Alkylkette unterscheiden, nicht getrennt werden. Die Massenspektren dieser niedrigeren Homologen waren den Spektren von MK-6(12H) und MK-6(10H) analog.

Tabelle 8: Chemische Verschiebungen aus den ^1H -NMR-Spektren der Menachinone MK-6(12H), MK-6(10H) und Methyl-MK-6(12H).

	MK-6(12H) MK-6(10H) δ [ppm]	Methyl- MK-6(12H) δ [ppm]
a) Aromatische Protonen (C-5 und/oder C-8 Position)	8,07	8,00
b) Aromatische Protonen (C-6 und/oder C-7 Position)	7,68	7,52/7,47
c) Bisallylisches CH_2 , erste Isopreneinheit, nur MK-6(10)	3,37	-
Benzenoide Methylgruppe, nur Methyl-MK-6(12H)	-	2,74
d) Allylisches CH_2 , erste Isopreneinheit, nur MK-6(12H) und Methyl-MK-6(12H)	2,62	2,59
e) Chinoide Methylgruppe	2,19	2,16
f) Wasser	1,55	1,55
g) Aliphatische Methin-, und Methylengruppen	1,0-1,4	1,0-1,4
h) Aliphatische Methylgruppen	0,85	0,85

Die Buchstaben a) bis h) beziehen sich auf die Resonanzsignale des ^1H -NMR-Spektrums in Abb. 27.

4.1.2 Analyse der DC-Bande mit R_F 0,75: Methylmenachinon

Die Bande mit R_F 0,75 enthält das noch nicht beschriebene Menachinonderivat 5- oder 8-Methyl-MK-6(12H) und in geringer Menge die homologe Verbindung mit fünf Isopentyleinheiten (Abb. 24).

Das UV-Spektrum der Bande mit R_F 0,75 zeigt Absorptionsmaxima bei 242, 247, 264, 275 und 335 nm und ist dem UV-Spektrum der oben beschriebenen gelben Bande sehr ähnlich. Im Massenspektrum der Bande mit R_F 0,75 sind das Molekulum m/z 606 als Basispeak und die charakteristischen Fragmentationen m/z 200, 201 vorhanden (Abb. 28). Daraus folgt, daß dieses Chinon ein Derivat des Menachinons MK-6(12H) mit einer zusätzlichen Methylgruppe am Benzolring des Naphthochinonsystems sein muß. Eine isomere Verbindung mit einer Ethylgruppe in Position 2 sollte ein intensives Fragmentation m/z 591 aufweisen.

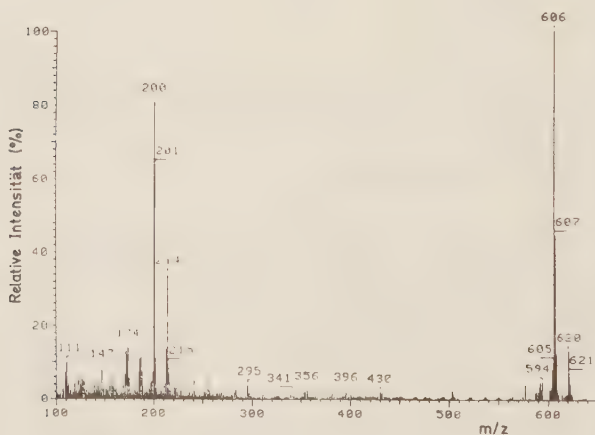


Abb.28. Massenspektrum (70 eV) von Menachinon Methyl-MK-6(12H), M_r 606.

Im ^1H -NMR-Spektrum zeigen Dupletts bei 8,00 und 7,47 ppm und das Tripletts bei 7,52 ppm, daß die Methylgruppe am Benzolring in Position 5 oder 8 sitzen muß (Abb. 29).

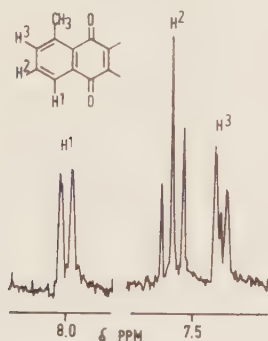


Abb. 29. Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, Deuteriochloroform) von Menachinon Methyl-MK-6(12H).

Aus den Massenspektren war weiter zu erkennen, daß in geringer Menge das homologe Chinon Methyl-MK-5(10H) vorhanden ist; außerdem weisen Signale geringer Intensität bei m/z 620 und 214 auf ein weiteres Chinon mit zwei Methylgruppen am Benzolring hin, das aus Materialmangel nicht genauer studiert werden konnte.

Menachinone mit einer vollständig gesättigten Seitenkette sind bei Eubakterien oder Archaeobakterien noch nicht beschrieben worden. Die bisher bekannten Menachinone besitzen isoprenoide Seitenketten, die maximal zu 50% hydriert sind (23). Phyllochinon (Vitamin K_1) kommt im Pflanzenreich vor und wurde bei Eubakterien bisher nur in Cyanobakterien gefunden (23). Dieses isoprenoide Chinon und zwei Homologe mit fünf bzw. sechs C_5 -Einheiten waren in geringer Menge auch in *Thermoproteus tenax* enthalten. Das Methylmenachinon Methyl-MK-6(12H) ist eine weitere neue Menachinonvariante. Entsprechende Chinone mit ungesättigten Seitenketten wurden in dem Archaeobakterium *Thermoplasma acidophilum* und einigen Eubakterien gefunden (37).

Einen Überblick der isoprenoiden Chinone aus *Thermoproteus tenax* gibt die Tabelle 9. Die angegebenen Verbindungen wurden sowohl in autotroph als auch in heterotroph gezogenem Material gefunden.

Tabelle 9: Isoprenoide Chinone aus *Thermoproteus tenax*.

Name	n	Massenspektren (m/z)					Relative Menge(%)
		M ⁺	Fragmentionen				
Typ 1							
MK-6(12H)	6	592	577	187	186		40±5
MK-5(10H)	5	522	507	187	186		5±4
MK-4(8H)	4	452	437	187	186		40±5
Typ 2							
MK-6(10H)	6	590	575	225	187	186	2±2
MK-5(8H)	5	520	505	225	(187)	(186)	<1
MK-4(6H)	4	450		(225)			2±2
Typ 3							
Methyl- MK-6(12H)	6	606	591	201	200		6±4
Methyl- MK-5(10H)	5	536		(201)	(200)		<1

n = Zahl der Isopentyl + Isopentenyl Einheiten;

Die Angaben Typ 1, 2, 3 beziehen sich auf die Nummern der Chinone in Abb. 24.

4.2 Isoprenoide Chinone aus *Desulfurolobus ambivalens*

Desulfurolobus ambivalens, ein schwefelabhängiges Archaeobakterium, vereint die Stoffwechseleigenschaften der Ordnungen Sulfolobales und Thermoproteales, indem es Schwefel unter aeroben Bedingungen oxidieren und unter anaeroben Bedingungen reduzieren kann. Deshalb ist die Frage nach den isoprenoiden Chinonen bei diesem Organismus besonders interessant.

Im Verlauf der Arbeit konnten isoprenoide Chinone aus den anaerob gezogenen Zellen isoliert werden. Dazu wurde das aufgeschlossene und lyophilisierte Zellmaterial mit n-Hexan extrahiert und der Extrakt mit analytischer DC auf Kieselgel (Laufmittelsystem Hexan/Diethylether 9:1) untersucht. Man beobachtete sechs UV-positive Banden, von denen sich jedoch nur eine schwach gelbliche Bande mit R_F 0,6 und eine Doppelbande (oberer Teil gelb, unterer Teil orange) mit R_F 0,5 durch Anfärbung mit Leukomethylenblau als Chinone zu erkennen gaben. Die massenspektrometrischen Untersuchungen aller Komponenten nach Isolierung mit präparativer DC bestätigten, daß nur die beiden farbigen Banden Chinonmaterial enthielten, und zwar zusammen etwa 0,2% des Lyophilisats.

4.2.1 Analyse der DC-Bande mit R_F 0,6: Menachinon MK-6(12H)

Die DC-Bande mit R_F 0,6 wurde mittels HPLC auf einer RP-18 Säule gereinigt. Die UV-, ^1H -NMR- und Massenspektren der Substanz sind identisch mit den Daten von Menachinon MK-6(12H) aus *Thermoproteus tenax* (s. Kapitel III.4.1.1). Die quantitative Abschätzung mittels HPLC ergab, daß der Anteil an Menachinon MK-6(12H) etwa 7% der gesamten Chinone aus *Desulfurolobus ambivalens* beträgt.

4.2.2 Analyse der DC-Doppelbande mit R_F 0,5: Caldariella- und Sulfolobus-chinone

Bei der gelbroten Doppelbande handelt es sich um ein Gemisch aus Caldariella-chinonen und den bisher noch nicht beschriebenen Sulfolobus-chinonen (Abb. 30). Die Sulfolobus-chinone sind neben dem Caldariella-chinon und einem isoprenoiden Methylthionaphthochinon, die einzigen bisher in Eubakterien oder Archaeobakterien gefundenen schwefelhaltigen Chinone (25, 37).

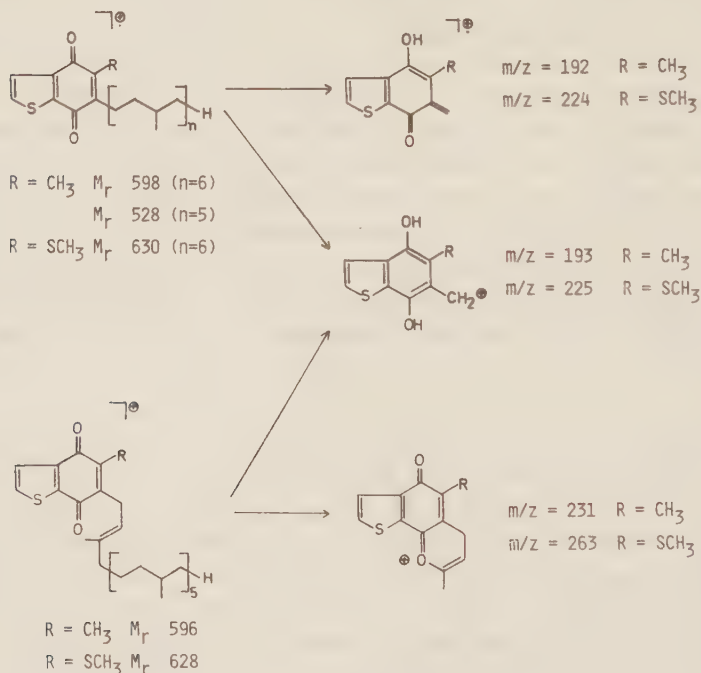


Abb. 30. Strukturen und Fragmentierungsschema der schwefelhaltigen, isoprenoiden Chinone aus *Desulfurolobus ambivalens*.

Der gelbe obere Teil der Doppelbande und der orange untere Teil wurden bei der präparativen Kieselgel-DC getrennt isoliert und mittels präparativer HPLC auf einer RP-18 Säule in die Einzelkomponenten aufgetrennt.

Die orangerote Komponente (ca. 40% des Chinonmaterials) erwies sich als das in *Sulfolobus*-Spezies gefundene *Caldariella*-chinon CQ-6(12H) (Abb. 2, Abb. 30). Das Massenspektrum (Abb. 31) zeigt den Basispeak bei m/z 630; die exakte Massenbestimmung ergibt eine Elementarzusammensetzung $C_{39}H_{66}O_2S_2$ (gefunden 630,4483; berechnet 630,4501).

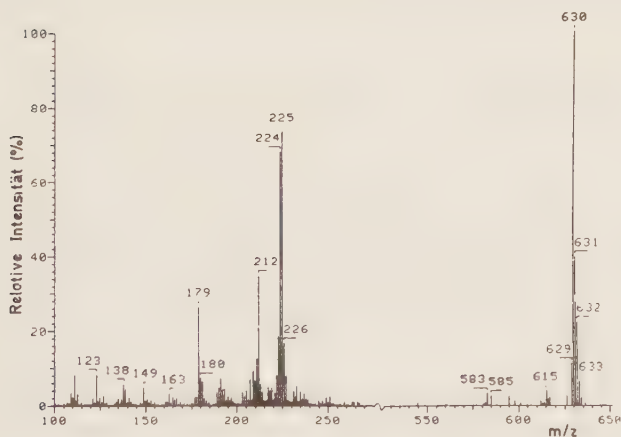


Abb. 31. Massenspektrum (70 eV) von *Caldariella*-chinon CQ-6(12H), M_r 630.

Intensive Fragmentionen m/z 224 und 225, und die Abwesenheit des Signals bei m/z 263 (Abb. 30) beweisen, zusammen mit NMR-Daten (Tabelle 10), die Anwesenheit einer Polyisopentyl-Seitenkette aus sechs C_5 -Einheiten. Fragmentionen geringer Intensität bei m/z 615 ($M - CH_3$) und 583 ($M - SCH_3$) sind charakteristisch für die Anwesenheit einer Thiomethylgruppe. Die Abspaltung der gesamten Alkylseitenkette, die nach einer Reduktion des Chinonsystems das Fragmention m/z 212 ergibt, wird durch die Thiomethylgruppe in ortho-Position induziert. Diese Art von Fragmentierung wird weder beim Sulfolobus-chinon (s. unten), noch bei Menachinonen und Methylmenachinonen beobachtet. Die UV-Spektren (Tabelle 11) und 1H -NMR-Spektren (Tabelle 10) dieser orangeroten Substanz stimmen mit den Literaturdaten des Caldariella-chinons überein (25, 76).

Die gelbe Komponente (etwa 40% des Chinongehaltes in *Desulfurolobus ambivalens*) ist ein bisher unbekanntes, schwefelhaltiges Chinon (Abb. 30), für das der Name Sulfolobus-chinon SQ-6(12H) vorgeschlagen wird. Das Massenspektrum (Abb. 32) zeigt das typische Spektrum eines polyisoprenoiden Chinons mit einem Molekülion m/z 598. Die exakte Massenbestimmung ergibt die Elementarzusammensetzung $C_{39}H_{66}O_2S$ (gefunden 598,4693; berechnet 598,4708) und deutet auf eine große Ähnlichkeit mit dem Caldariella-chinon. In der Tat kann die massenspektroskopische Fragmentierung durch Vergleich der beiden Massenspektren leicht gedeutet werden. Die Molekülionen zeigen eine Massendifferenz von 32 Masseneinheiten; die intensiven Signale von SQ-6(12H) bei m/z 192, 193 sind den Signalen bei m/z 224, 225 in CQ-6(12H) analog und deuten mit einer Differenz von ebenfalls 32 Masseneinheiten auf die Anwesenheit von nur einem Schwefelatom als Teil des Chinonsystems. Im Massenspektrum von SQ-6(12H) fehlt das Fragmention bei $M-47$ ($M-SCH_3$) ebenso wie das durch Abspaltung der gesamten Alkylseitenkette entstehende Ion m/z 180.

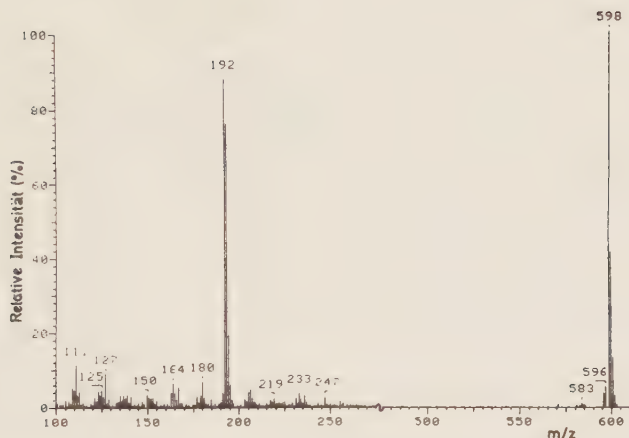


Abb. 32. Massenspektrum (70 eV) von Sulfolobus-chinon SQ-6(12H), M_r 598.

Die Struktur des Sulfolobus-chinons als ein 6-(3,7,11,-15,19,23-Hexamethyltetracosyl)-5-methylbenz[b]thiophen-4,7-chinon wird durch $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestätigt (Tabelle 10). Die Daten zeigen eine perhydrierte Alkylseitenkette mit sieben Methylgruppen, einer Methylgruppe am Chinonkern und einen Thiophenring, der an den Chinonkern ankondensiert ist. Das UV-Spektrum von SQ-6(12H) unterscheidet sich deutlich von dem Spektrum von CQ-6(12H); durch das Fehlen des Schwefelatoms in Position 5 ist ein neues chromophores System entstanden (Tabelle 11).

Tabelle 10: ^1H -NMR-Daten der Chinone aus *Desulfurolobus ambivalens* (in Deuteriochloroform).

Protonen	MK-6(12H)		CQ-6(12H)		SQ-6(12H)	
	δ [ppm]	Int.	δ [ppm]	Int.	δ [ppm]	Int.
Aromatische	8,09 m	2H	7,58 d	1H	7,57 d	1H
	7,67 m	2H	7,52 d	1H	7,51 d	1H
Chinoide	2,19 s	3H	2,62 s	3H	2,12 s	3H
Methyl-						
Allylische	2,63 m	2H	2,81 m	2H	2,57 m	2H
Methyl-						
Aliphatische	1,25 b	38H	1,21 b	38H	1,21 b	38H
CH_2 -, CH_3 -						
Aliphatische	0,98 d	21H	0,98 d	21H	0,97 d	21H
Methyl-	0,86 d		0,86 d		0,86 d	

Int. = Integration der Signale; m = Multipllett;

s = Singulett; d = Duplett; b = breites Signal.

Tabelle 11: UV/VIS-Daten von isoprenoiden Chinonen aus *Desulfurolobus ambivalens* in Hexan.

	MK-6(12H)	CQ-6(12H)	SQ-6(12H)
λ_{max} [nm]	241 ($\approx 1,0$)	239 ($\approx 1,0$)	225 ($\approx 1,0$)
	247 (1,1)		
	261 (0,9)		
	270 (0,9)	273 (0,6)	270 (1,2)
		280 (0,6)	279 (1,4)
	324 (0,2)	320 (0,4)	321 (0,2)
		456 (0,1)	

Zahlen in Klammern: relative Absorptionswerte.

Aus den kleineren HPLC-Peaks wurden niedere Homologe des Sulfolobus-chinons isoliert und durch Massenspektren charakterisiert. Desulfurolobus ambivalens enthält etwa 8% SQ-5(10H), M_r 528, und in Mengen unter 1% SQ-4(8H), M_r 458. Als Spurenkomponenten konnten die Chinone der Massen 628 und 596 identifiziert werden; gemäß ihrer Fragmentionen m/z 263 bzw. 231 (Abb. 30) handelt es sich um Chinone vom Phyllochinontyp, nämlich um CQ-6(10H) und SQ-6(10H).

Tabelle 12 gibt einen Überblick über die in Desulfurolobus ambivalens gefundenen Chinone; die Mengenverhältnisse wurden durch HPLC-Analyse abgeschätzt.

Tabelle 12: Isoprenoide Chinone aus Desulfurolobus ambivalens.

Name	n	Massenspektren (m/z)							Relative
		M ⁺	Fragmentationen						Menge(%)

Typ 1									
CQ-6(12H)	6	630	615	583	225	224	212	179	40±5
SQ-6(12H)	6	598	583		193	192			40±5
SQ-5(10H)	5	528	513		193	192			8±5
SQ-4(8H)	4	458	443		193	192			<1
SQ-3(6H)	3	388			193	192			<1
MK-6(12H)	6	592	577		187	186			7±5
Typ 2									
CQ-6(10H)	6	628	613		263				<1
SQ-6(10H)	6	596	581		231				<1

n = Zahl der Isopentyl- und Isopentenyl-Einheiten;

Typ 1 = Chinone, die nur Isopentyl-Einheiten enthalten;

Typ 2 = Chinone, die Isopentyl- und Isopentenyl-Einheiten enthalten.

4.3 Isoprenoide Chinone in *Thermococcus celer*, *Desulfurococcus mobilis* und *Desulfurococcus mucosus*

Die schwefelabhängigen Archaeobakterien *Thermococcus celer* (29), *Desulfurococcus mucosus* und *Desulfurococcus mobilis* (30) reduzieren, wie *Thermoproteus tenax*, Schwefel zu Schwefelwasserstoff, können jedoch nur heterotroph wachsen. Diese Organismen wurden mit den bei *Desulfurolobus ambivalens* beschriebenen Methoden auf die Anwesenheit isoprenoider Chinone untersucht. In *Thermococcus celer* wurden durch präparative Kieselgel-DC mit dem Laufmittelsystem Hexan/Diethylether 85:15 zwei bei 254 nm absorbierende Zonen mit R_F 0,8 bzw. 0,6 isoliert. Nach den Massenspektren handelte es sich nicht um Chinone, sondern um undefinierbare Verunreinigungen. In den beiden *Desulfurococcus*-Spezies wurden jeweils vier UV-Licht absorbierende Banden mit den R_F -Werten 0,8, 0,6, 0,3 und 0,2 isoliert, die nach ihren Massenspektren ebenfalls keine Chinone waren. Das bedeutet, daß *Thermococcus celer* und die beiden *Desulfurococcus*-Spezies keine Chinone bzw. weniger als 0,002% Chinone vom Lyophilisat enthalten. Dies entspricht der Nachweisgrenze für isoprenoide Chinone, bei den zur Verfü- gung stehenden Mengen an Zellmaterial.

4.4 Diskussion der Ergebnisse der Analyse der isoprenoiden Chinone

In Eubakterien spielen isoprenoide Chinone eine Rolle bei der Energiegewinnung der Organismen, d.h. bei Elektronentransportvorgängen in der Cytoplasmamembran. Es ist wahrscheinlich, daß die in diesem Kapitel beschriebenen isoprenoiden Chinone aus verschiedenen Archaeobakterien ebenfalls in der Cytoplasmamembran vorkommen und katalytische Funktion bei der Energiegewinnung haben. Es scheint ein Zusammenhang zwischen den Stoffwechseltypen der einzelnen Archaeobakterien und den darin enthaltenen isoprenoiden Chinonen zu bestehen. So enthalten die aerob wachsenden *Sulfolobus*-Arten *Sulfolobus solfataricus*, *acidocaldarius* bzw. *brierleyi*, die Schwefel zu Schwefelsäure oxidieren, *Caldariella*-chinon als Hauptkomponente, während das Archaeobakterium *Thermoproteus tenax*, das Schwefel zu Schwefelwasserstoff reduziert, verschiedene Menachinone besitzt. *Desulfurolobus ambivalens*, ein Archaeobakterium, das sowohl aerob, als auch anaerob durch Oxidation bzw. Reduktion von Schwefel wachsen kann, enthält, wenn es anaerob gezogen wird, *Caldariella*-chinon, *Sulfolobus*-chinone und als Nebenkomponekte ein Menachinon. Es wäre in diesem Zusammenhang interessant, die isoprenoiden Chinone von aerob gezogenen Zellen von *Desulfurolobus ambivalens* zu untersuchen. Die verschiedenen Typen von energieliefernden Redoxprozessen erfordern möglicherweise isoprenoiden Chinone mit geeigneten Redoxpotentialen. Die Kenntnis der Redoxpotentiale dieser Chinone ist deshalb von Interesse.

Es sollte jedoch festgehalten werden, daß ein Beweis für die Beteiligung der gefundenen isoprenoiden Chinone am Stoffwechsel der Archaeobakterien im Sinne eines Funktionstestes bisher fehlt. Die Abwesenheit isoprenoider Chinone in *Thermococcus celer*, *Desulfurococcus*-Spezies und einigen Eubakterien (23) zeigt, daß sie keine notwendige Voraus-

setzung für den Stoffwechsel von Archaeobakterien bzw. Eubakterien sind.

Menachinone und Ubichinone aus Eubakterien enthalten meist längere isoprenoide Seitenketten (in der Regel 7, 8, 9 oder 10 C_5 -Einheiten) als die Chinone aus Archaeobakterien. Halobakterien besitzen in dem Menachinon MK-8 (acht Isopentyleinheiten) das Chinon mit der längsten Alkylseitenkette innerhalb der Archaeobakterien (23).

Bei den schwefelabhängigen Archaeobakterien wurden bisher überwiegend Chinone mit sechs isoprenoiden Einheiten gefunden; Nebenprodukte waren Homologe mit fünf, vier oder drei C_5 -Einheiten. Von der Biosynthese von Vitamin K in Eubakterien weiß man, daß die Seitenkette zuerst aus Mevalonat synthetisiert und danach an das Chinonsystem gebunden wird (77). Wahrscheinlich wird die Seitenkette auch in Archaeobakterien über Mevalonat gebildet, doch die Frage bleibt offen, warum bei der Chinon-Biosynthese in schwefelabhängigen Archaeobakterien die Alkylseitenkette bei sechs isoprenoiden Einheiten ihr Maximum erreicht und dann abbricht. Wie oben beschrieben, wurden zwar Nebenprodukte mit kürzeren Seitenketten gefunden, doch keine Spuren von Chinonen mit längeren Alkylketten. Vielleicht steht dies in Zusammenhang mit dem Bau der Cytoplasmamembran, die im Gegensatz zu den übrigen Archae- bzw. Eubakterien als Lipidkomponenten "monolayer" bildende Tetraether mit Alkylketten aus acht C_5 -Einheiten enthält. In methanogenen Archaeobakterien, in denen ebenfalls Tetraether vorkommen, wurden isoprenoide Chinone bisher noch kaum untersucht.

Isoprenoide Chinone sind in Eubakterien weit verbreitet und werden als taxonomische Markersubstanzen verwendet; es dominieren Menachinone und Ubichinone, während andere Chinontypen kaum auftreten. Halobakterien enthalten Menachinone (23); Thermoplasma enthält Menachinone und ein Methylmenachinon (23). Bei schwefelabhängigen Archaeobakterien wurde in den wenigen bisher untersuchten Vertretern eine erstaunliche Vielfalt verschiedener Chinone gefunden: Caldariella-chinone (25, 76, 78), Sulfolobus-chinone (78), Menachinone bzw. Methylmenachinone mit perhydrierter Seitenkette (79) und Menachinone vom Phyllochinontyp (79). Daneben gibt es Vertreter, die keine isoprenoiden Chinone enthalten (78).

Somit zeigen die Archaeobakterien, vor allem die schwefelabhängigen Archaeobakterien, in ihren isoprenoiden Chinonen eine größere Vielfalt als die Eubakterien. Dies stützt die Hypothese, daß Archaeobakterien eine große "phylogenetische Tiefe" aufweisen (5).

Die Ergebnisse des Kapitels III.4. wurden kürzlich publiziert (78, 79).

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Archaeobakterien unterscheiden sich auf molekularer Ebene von eukaryontischen Zellen oder Eubakterien in einer Vielzahl von Eigenschaften: besonders auffallend sind die Unterschiede in der Struktur der Membranlipide. Bei Eubakterien und Eukaryonten dominieren Esterlipide aus Glycerin und Fettsäuren, während Archaeobakterien Etherlipide aus Glycerin oder höherwertigen Alkoholen und perhydrierten, isoprenoiden Kohlenwasserstoffen enthalten. In einigen Archaeobakterien wurden Etherlipide (Glycerin-tetraether) gefunden, die die gesamte biologische Membran durchspannen und eine "monolayer" Membran anstelle der sonst üblichen "bilayer" Membran bilden.

Als weitere lipide Komponenten der Cytoplasmamembran fand man in Eubakterien und einigen Archaeobakterien isoprenoide Chinone, die vermutlich bei Elektronentransportvorgängen eine Rolle spielen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Lipide aus autotroph und heterotroph gezogenen Zellen des schwefelabhängigen Archaeobakteriums *Thermoproteus tenax* charakterisiert, sowie Lipide aus einigen anderen schwefelabhängigen Archaeobakterien untersucht.

Die mengenmäßig vorherrschenden Lipide aus *Thermoproteus tenax* wurden mit Hilfe chromatographischer Methoden isoliert und durch chemische Abbaureaktionen und spektroskopische Untersuchungen charakterisiert.

Thermoproteus tenax enthält, bezogen auf das Zelltrockengewicht, 6% Lipide, die sich aus 5% Neutral-, 20% Glyko- und 75% Phospholipiden zusammensetzen. Bei den Lipiden handelt es sich um typisch archaeobakterielle Etherlipide; Fettsäuren oder Fettsäureester kommen nicht vor.

Die hydrophoben Grundkörper bestehen aus 5% Glycerin-diether

und 95% Diglycerin-tetraethern. Die Tetraether aus autotroph gezogenen Zellen sind ein annähernd aquimolares Gemisch aus sechs Komponenten, die sich in der Zahl (0-4) oder Anordnung der Cyclopentanringe in den isoprenoiden Kohlenwasserstoffketten unterscheiden. In heterotroph gezogenen Zellen dominiert der Tetraether vom 2+2 Typ (4 Cyclopentanringe). Der Cyclisierungsgrad der Tetraether ist der einzige Unterschied der Lipide aus autotroph und heterotroph gezuchteten Zellen. Mit Ausnahme des noch nicht beschriebenen Tetraethers vom 0+2 Typ, sind die hydrophoben Grundkörper von *Thermoproteus tenax* bereits in anderen Archaeobakterien gefunden worden.

Neben den hydrophoben Grundkörpern wurden einige neue polare Lipide aus *Thermoproteus tenax* charakterisiert. Die Glykolipide stellen vor allem β -(1 $\rightarrow$ 6)-verknüpfte Mono-, Di- und Triglycoside der Diglycerin-tetraether dar. Die Phospholipide sind überwiegend Phosphoglykolipide, die formal aus den Glykolipiden durch Bindung von Inositphosphat an die zweite Hydroxylgruppe der Tetraether hervorgehen. Die Hauptkomponente (50% der Gesamtlipide) ist das Monoglucosyl-diglycerin-tetraether-myo-inositphosphat. Bisher sind nur wenige Strukturen polarer Lipide aus Archaeobakterien bekannt (3, 15). Die polaren Tetraetherlipide aus *Methanospirillum hungatei*, *Thermoplasma acidophilum*, *Sulfolobus solfataricus* und *Thermoproteus tenax* besitzen folgenden gemeinsamen Bauplan: bei den Glykolipiden sind alle Zuckerreste an eine Hydroxylgruppe der Tetraether gebunden; bei den Phosphoglykolipiden ist die zweite Hydroxylgruppe zusätzlich durch Glycerinphosphat oder Inositphosphat substituiert. Das bedeutet, daß sich die Zucker- und Phosphatgruppen eines Moleküls auf verschiedenen Seiten der Cytoplasmamembran befinden.

Mit einigen der bei *Thermoproteus tenax* angewendeten Methoden wurden die Glycerolipide der schwefelabhängigen Archaeobakterien *Thermoproteus species* H₃ und *Sulfolobus* B6/2

untersucht. Beide Organismen enthalten die für ihre jeweilige Gattung typischen Lipide; dies bestätigt die taxonomische Einordnung dieser, in der Literatur noch nicht beschriebenen, Archaeobakterien.

Aus einigen schwefelabhängigen Archaeobakterien wurden mehrere, noch nicht beschriebene isoprenoide Chinone, sowie einige bereits bekannte Chinone, isoliert und mittels spektroskopischer Methoden charakterisiert.

Thermoproteus tenax enthält acht verschiedene Chinone vom Menachinontyp. Die isoprenoiden Seitenketten sind bei fünf Komponenten, im Gegensatz zu den bisher gefundenen Menachinonen, perhydriert; drei Komponenten besitzen eine Doppelbindung in der ersten Isopreneinheit der Seitenkette und gehören somit zum Phyllochinontyp.

Das anaerob gezogene Archaeobakterium **Desulfurolobus ambivalens** enthält das in Sulfolobus-Spezies gefundene Caldariella-chinon und die noch nicht beschriebenen, schwefelhaltigen Sulfolobus-chinone, bei denen die Thiomethylgruppe des Caldariellachinons durch eine Methylgruppe ersetzt ist. In geringer Menge wurde außerdem ein Menachinon nachgewiesen.

Bei **Thermococcus celer**, **Desulfurococcus mucosus** und **Desulfurococcus mobilis** wurden keine isoprenoiden Chinone gefunden.

V. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Woese, C.R. & Fox, G.E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5088-5090.
- (2) Fox, G.E., Stackebrandt, E., Hespell, R.B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T.A., Wolfe, R.S., Balch, W.E., Tanner, R.S., Magrum, L.J., Zablen, L.B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B.J., Stahl, D.A., Luehrsén, K.R., Chen, K.N. & Woese, C.R. (1980) The phylogeny of prokaryotes; Science 209, 457-463.
- (3) Langworthy, T.A. (1985) Lipids of archaeobacteria; in The Bacteria, Vol. VIII, pp. 459-497, Academic Press.
- (4) Kandler, O. (1982) Cell wall structures and their phylogenetic implications; Zentralbl. Bakteriöl. Hyg. I. Abt. Orig. C 3, 149-160.
- (5) Zillig, W., Schnabel, R. & Stetter, K.O. (1985) Archaeobacteria and the origin of the eukaryotic cytoplasm; Curr. Topics Microbiöl. Immunöl. 144, 1-18.
- (6) Kessel, M. & Klink, F. (1980) Archaeobacterial elongation factor is ADP-ribosylated by diphtheria toxin; Nature (London) 287, 250-251.
- (7) Matheson, A.T. & Yaguchi, M. (1982) The evolution of the archaeobacterial ribosome; Zentralbl. Bakteriöl. Hyg. I. Abt. Orig. C 3, 192-199.
- (8) Woese, C.R. (1981) Archaeobakterien - Zeugen aus der Urzeit des Lebens; Spektrum der Wissenschaft 8, 75-91.

- (9) Schlegel, G.H. (1981) Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- (10) Darland, G., Brock, T.D., Samsonoff, W. & Conti, S.F. (1970) A thermophile acidophilic mycoplasma isolated from a coal refuse pile; Science 170, 1416-1418.
- (11) Wagner, G. (1979) Halobakterien: Vordringen in biotische Grenzbereiche; Biologie in unserer Zeit 6, 171-179.
- (12) Stetter, K.O. (1985) Extrem thermophile Bakterien; Naturwissenschaften 72, 291-301.
- (13) Brock, T.D. (1985) Life at high temperatures; Science 230, 132-138.
- (14) Thiele, W.O. (1979) Lipide. Isoprenoide mit Steroiden. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- (15) De Rosa, M., Gambacorta, A. & Gliozzi, A. (1986) Structure, biosynthesis, and physicochemical properties of archaebacterial lipids; Microbiol. Rev. 50, 70-80.
- (16) Kates, M., Wassef, M.K. & Kushner, D.J. (1968) Radioisotopic studies on the biosynthesis of the glyceryl diether lipids of Halobacterium cutirubrum; Can. J. Biochem. 46, 971-977.
- (17) Pugh, E.L., Wassef, M.K. & Kates, M. (1971) Inhibition of fatty acid synthetase in Halobacterium cutirubrum and Escherichia coli by high salt concentrations; Can. J. Biochem. 49, 953-958.
- (18) Schafer, W. & Oesterhelt, D. persönliche Mitteilung.

- (19) De Rosa, M., De Rosa, S., Gambacorta, A. & Bu'Lock, J.D. (1980) Structure of calditol, a new branched-chain nonitol, and of the derived tetraether lipids in thermoacidophile archaeobacteria of the *Caldariella* group; *Phytochemistry* 19, 249-254.
- (20) Tornabene, T.G. (1985) Lipid analysis and the relationship to chemotaxonomy; *Methods Microbiol.* 18, 209-233.
- (21) De Rosa, M., Gambacorta, A., Lanzotti, V., Trincone, A., Harris, J.E. & Grant, W.D. (1986) A range of ether core lipids from the methanogenic archaeobacterium *Methanosarcina barkeri*; *Biochem. Biophys. Acta* 875, 487-492.
- (22) Singer, S.J. & Nicolson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes; *Science* 175, 720-731.
- (23) Collins, M.D. & Jones, D. (1981) Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications; *Microbiol. Rev.* 45, 316-354.
- (24) Collins, M.D. (1985) Structure of thermoplasmaquinone from *Thermoplasma acidophilum*; *FEMS Microbiol. Lett.* 28, 21-23.
- (25) De Rosa, M., De Rosa, S., Gambacorta, A., Minale, L., Thomson, R.H. & Worthington, R.D. (1977) *Caldariella*-quinone, a unique benzo[b]thiophen-4,7-quinone from *Caldariella acidophila*, an extremely thermophilic and acidophilic bacterium; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 653-657.

- (26) Zillig, W., Stetter, K.O., Schafer, W., Janekovic, D., Wunderl, S., Holz, I. & Palm, P. (1981) Thermo-proteales; a novel type of extremely thermoacidophilic anaerobic archaeobacteria isolated from icelandic solfataras; Zentralbl. Bakteriол. Hyg. I. Abt. Orig. C 2, 205-227.
- (27) Fischer, F., Zillig, W., Stetter, K.O. & Schreiber, G. (1983) Chemolithoautotrophic metabolism of anaerobic extremely thermophilic archaeobacteria; Nature (London) 301, 511-513.
- (28) Zillig, W., Yeats, S., Holz, I., Bock, A., Rettenberger, M., Gropp, F. & Simon, G. (1986) Desulfurolobus ambivalens gen. nov. sp. nov., an autotrophic archaeobacterium facultatively oxidizing or reducing sulfur: in press.
- (29) Zillig, W., Holz, I., Janekovic, D., Schafer, W. & Reiter, W.D. (1983) The archaeobacterium Thermococcus celer represents, a novel genus within the thermophilic branch of the archaeobacteria; System. Appl. Microbiol. 4, 88-94.
- (30) Zillig, W., Stetter, K.O., Prangishvilli, D., Schäfer, W., Wunderl, S., Janekovic, D., Holz, I. & Palm, P. (1982) Desulfurococcaceae, the second family of the extremely thermophilic, anaerobic, sulfur-respiring Thermoproteales; Zentralbl. Bakteriол. Hyg. I. Abt. Orig. C 3, 304-317.
- (31) Zillig, W., Yeats, S., Holz, I., Bock, A., Gropp, F., Rettenberger, M. & Lutz, S. (1985) Plasmid-related anaerobic autotrophy of the novel archaeobacterium Sulfolobus ambivalens; Nature (London) 313, 789-791.

- (32) Seegerer, A., Stetter, K.O. & Klink, F. (1985) Two contrary modes of chemolithotrophy in the same archaeobacterium; *Nature* (London) 313, 787-789.
- (33) Brock, T.D., Brock, K.M., Belly, R.T. & Weiss, R.L. (1972) *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature; *Arch. Mikrobiol.* 84, 54-68.
- (34) Langworthy, T.A. (1982) Lipids of *Thermoplasma*: Methods in *Enzym.* 88, 396-406.
- (35) Rouser, G., Kritchevsky, G., Yamamoto, A., Simon, G., Galli, C. & Bauman, A.J. (1969) Diethylaminoethyl and triethylaminoethyl cellulose column chromatographic procedures for phospholipids, glykolipids and pigments; *Methods in Enzym.* 14, 272-317.
- (36) Langworthy, T.A., Mayberry, W.R. & Smith, P.F. (1974) Long-chain glycerol diether and polyol dialkyl glycerol triether lipids of *Sulfolobus acidocaldarius*; *J. Bacteriol.* 119, 106-116.
- (37) Collins, M.D. (1985) Analysis of isoprenoid quinones; *Methods Microbiol.* 18, 329-366.
- (38) Stahl, E. (1967) *Dünnschichtchromatographie*, Springer-Verlag.
- (39) Dittmer, J.C. & Lester, R.L. (1964) A simple, specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms; *J. Lipid Res.* 5, 126-127.
- (40) Batley, M., Packer, N.H. & Redmond, J.W. (1980) High-performance liquid chromatography of diglyceride p-nitrobenzoates; *J. Chrom.* 198, 520-525.

- (41) Dittmer, J.C. & Wells, M.A. (1969) Quantitative and qualitative analysis of lipids and lipid components; *Methods in Enzym.* 14, 482-530.
- (42) Shearer, M.J. (1983) High-performance liquid chromatography of K vitamins and their antagonists; *Advances in Chromatography* 21, 243-301.
- (43) Hakomori, S.I. (1964) A rapid permethylation of glykolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide; *J. Biochem.* 55, 205-208.
- (44) Vollmer, A. (1984) Dissertation an der Universität München.
- (45) Rauvala, H. (1979) Use of triphenylmethane as an indicator of complete methylation of glycolipids and glycopeptides; *Carb. Res.* 72, 257-260.
- (46) Eggstein, M. & Kuhlmann, E. (1974) in *Methoden der enzymatischen Analyse* (Bergmeyer, H.U., Hrsg.) Bd. 2, S. 1871-1877, Verlag Chemie, Weinheim.
- (47) Eibl, H. & Lands, W.E.M. (1969) A new sensitive determination of phosphate; *Anal. Biochem.* 30, 51-57.
- (48) Eibl, H. & Lands, W.E.M. (1970) Phosphorylation of 1-alkenyl-2-acylglycerol and preparation of 2-acyl-phosphoglycerides; *Biochemistry* 9, 423-428.
- (49) Hopp, W. (1982) Über Lipide bei Archaeobakterien; Diplomarbeit an der Universität München.
- (50) Goldfine, H. (1982) Lipids of prokaryotes - structure and distribution; *Curr. Topics Membr. Transp.* 17, 1-43.

- (51) Thiele, W.O., Dreysel, J. & Hermann, D. (1972) The "free" lipids of two different strains of hydrogen-oxidizing bacteria in relation to their growth phases; Eur. J. Biochem. 29, 224-236.
- (52) Ishida, M., Suyama, K. & Adachi, S. (1980) Background contamination by phthalates commonly encountered in the chromatographic analysis of lipid samples; J. Chrom. 189, 421-424.
- (53) De Rosa, M., De Rosa, S., Gambacorta, A., Minale, L. & Bu'Lock, J.D. (1977) Chemical structure of the ether lipids of thermophilic acidophilic bacteria of the Caldariella group; Phytochemistry 16, 1961-1965.
- (54) De Rosa, M., De Rosa, S. & Gambacorta, A. (1977) Lipid structures in the Caldariella group of extreme thermo-acidophile bacteria; J. C. S. Chem. Comm. 447, 514-515.
- (55) DeJongh, D.C., Radford, T., Hribar, J.D., Hanessian, S., Bieber, M., Dawson, G. & Sweeley, C.C. (1969) Analysis of trimethylsilyl derivatives of carbohydrates by gas chromatography and mass spectrometry; J. Am. Chem. Soc. 91, 1728-1740.
- (56) Elliott, W.H. & Waller, G.R. (1972) in Biochemical Applications of Mass Spectrometry (Waller, G.R., ed.) pp. 532-536, Wiley-Interscience, New York.
- (57) Kates, M., Kushwaha, S.C. & Sprott, G.D. (1982) Lipids of purple membrane from extreme halophiles and of methanogenic bacteria; Methods in Enzym. 88, 98-111.
- (58) Langworthy, T.A. (1977) Long-chain diglycerol tetraethers from Thermoplasma acidophilum; Biochem. Biophys. Acta 487, 37-50.

- (59) De Rosa, M., Gambacorta, A., Nicolaus, B., Sodano, S. & Bu'Lock, J.D. (1980) Structural regularities in tetra-ether lipids of *Caldariella* and their biosynthetic and phyletic implications; *Phytochemistry* 19, 833-836.
- (60) Abrahamsson, S., Ställberg-Stenhagen, S. & Stenhagen, E. (1963) The higher saturated branched chain fatty acids; *Prog. Chem. Fats other Lipids* 7, 1-164.
- (61) Kates, M. (1978) The phytanyl ether-linked polar lipids and isoprenoid neutral lipids of extremely halophilic bacteria; *Prog. Chem. Fats other Lipids* 15, 301-342.
- (62) De Rosa, M., De Rosa, S. & Gambacorta, A. (1977) ^{13}C -NMR assignments and biosynthetic data for the ether lipids of *Caldariella*; *Phytochemistry* 16, 1909-1912.
- (63) De Rosa, M., Gambacorta, A., Nicolaus, B. & Bu'Lock, J.D. (1980) Complex lipids of *Caldariella acidophila*, a thermoacidophile archaeobacterium; *Phytochemistry* 19, 821-825.
- (64) Bock, K., Pederson, C. & Pederson, H. (1984) Carbon-13 nuclear magnetic resonance data for oligosaccharides; *Adv. Carb. Chem. Biochem.* 42, 193-225.
- (65) Bjorndal, H., Hellerqvist, C.G., Lindberg, B. & Svensson, S. (1970) Gas-Flüssigkeits-Chromatographie und Massenspektrometrie bei der Methylierungsanalyse von Polysacchariden; *Angew. Chem.* 82, 643-652
- (66) Meier, H. (1984) in *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie* (Hesse, M., Meier, H. & Zeeh, B., Hrsg.) S. 93-273, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- (67) De Rosa, M., Gambacorta, A., Nicolaus, B., Chappe, B. &

- Albrecht, P. (1983) Isoprenoid ethers; backbone of complex lipids of the archaebacterium *Sulfolobus solfataricus*; *Biochem. Biophys. Acta* 753, 249-256.
- (68) Smallbone, B.W. & Kates, M. (1981) Structural identification of minor glycolipids in *Halobacterium cutirubrum*; *Biochem. Biophys. Acta* 665, 551-558.
- (69) Kushawa, S.C., Kates, M., Sprott, G.D. & Smith, I.C.P. (1981) Novel polar lipids from the methanogen *Methanospirillum hungatei* GP1; *Biochem. Biophys. Acta* 664, 156-173.
- (70) Henderson, R., Jubb, J.S. & Whytock, S. (1978) Specific labelling of the protein and lipid on the extracellular surface of purple membrane; *J. Mol. Biol.* 123, 259-274.
- (71) Rottem, S. (1982) Transbilayer distribution of lipids in microbial membranes; *Curr. Topics Membr. Transp.* 17, 235-261.
- (72) Langworthy, T.A. (1977) Comparative distribution of heterotrophically and autotrophically grown *Sulfolobus acidocaldarius*; *J. Bact.* 130, 1326-1332.
- (73) Langworthy, T.A., Tornabene, T.G. & Holzer, G. (1982) Lipids of Archaeobacteria; *Zentralbl. Bakterirol. Hyg., I. Abt. Orig. C* 3, 228-244.
- (74) Zillig, W. persönliche Mitteilung.
- (75) Sommer, P. & Kofler, M. (1966) Physicochemical properties and methods of analysis of phyloquinones, menaquinones, ubiquinones, plastoquinones, menadione, and related compounds; *Vitamins and hormones* 24, 349-399.

- (76) Collins, M.D. & Langworthy, T.A. (1983) Respiratory quinone composition of some acidophilic bacteria: System. Appl. Microbiol. 4, 295-304.
- (77) Bentley, R. & Meganathan, R. (1982) Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria; Microbiol. Rev. 46, 241-280.
- (78) Thurl, S., Witke, W., Buhrow, I. & Schafer, W. (1986) Different types of quinones from sulfur-dependent archaebacteria; Biol. Chem. Hoppe-Seyler 367, 191-197.
- (79) Thurl, S., Buhrow, I. & Schäfer, W. (1985) New types of menaquinones from the thermophilic archaebacterium Thermoproteus tenax; Biol. Chem. Hoppe-Seyler 366, 1079-1083.

VI. ABKÜRZUNGEN

aut	=	autotroph
CQ	=	Caldariella-chinon: 6-(3,7,11,15,19,23-Hexamethyltetracosyl)- 5-(methylthio)benz[b]thiophen-4,7-chinon
DC	=	Dünnschichtchromatographie bzw. Dünnschicht- chromatogramm
DEAE	=	Diethylaminoethyl
DMSO	=	Dimethylsulfoxid
FAB	=	fast atom bombardment
GC	=	Gaschromatographie
GC/HIS	=	Gaschromatographie und Detektion ausgewählter Ionen im Massenspektrometer (multiple ion selection)
GC/MS	=	gekoppelte Gaschromatographie und Massenspektroskopie
GL	=	Glykolipid
het	=	heterotroph
HPLC	=	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HPTLC	=	hochauflösende Dünnschichtchromatographie
IR	=	Infrarot
M ⁺	=	Molekülion
MeOH	=	Methanol
MK	=	Menachinon: 2-Methyl-3-polyisopentenyl-1,4-naphthochinon
M _r	=	Relative Molekularmasse
MS	=	Massenspektroskopie
m/z	=	Masse / Elementarladung
NL	=	Neutrallipid
NMR	=	nuclear magnetic resonance
PL	=	Phospholipid
R _F	=	Laufstrecke der Substanz / Abstand Start-Front

RP	=	reverse-phase (Umkehrphase)
SC	=	Säulenchromatographie
SQ	=	Sulfolobus-chinon: 6-(3,7,11,15,19,23-Hexamethyltetracosyl)- 5-methylbenz[blthiophen-4,7-chinon
TMS	=	Trimethylsilyl
UV	=	Ultraviolett

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter Anleitung von Prof. Dr. W. Schäfer angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. W. Schäfer sehr für motivierende Diskussionen und die standige Bereitschaft zu Rat und Tat.

Herrn Prof. Dr. W. Zillig danke ich für die großzügige Bereitstellung des Zellmaterials.

Ich bedanke mich

bei Herrn Prof. Dr. W. Schäfer und Frau I. Buhrow für die Durchführung und Interpretation der massenspektroskopischen Messungen,

bei Herrn W. Witke für die Hilfe bei der Analyse der isoprenoiden Chinone,

bei Herrn Prof. Dr. J. Sonnenbichler und Frau T. Schild für die Messung und Diskussion der NMR-Spektren,

bei Herrn M. Rettenberger für hilfreiche Diskussionen und

bei meiner Schwester Claudia für das Tippen des Manuskripts.

Meinen Kolleginnen und Kollegen Frau I. Buhrow, Frau J. Mayer, Frau C. Oberstötter und Herrn Dr. H. Gonschor danke ich für die gute "Laboratmosphäre".

Lebenslauf

Name: Stephan Thurl
Geburtsdatum: 15. Juli 1959
Geburtsort: Rosenheim
Eltern: Gertrud und Walter Thurl
1965-1969 Grundschule in Schloßberg
1969-1978 Finsterwalder-Gymnasium in Rosenheim
1978 Abitur
1978-1982 Studium der Lebensmittelchemie an der
Ludwig-Maximilians-Universität in München
1982 1. Staatsexamen
seit 1983 Doktorarbeit unter Anleitung von
Prof. Dr. W. Schäfer am Max-Planck-
Institut für Biochemie in Martinsried

